

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ-ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ
ΠΟΙΟΤΗΤΑ & ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ - ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ»



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Αξιολόγηση εμπορικών συσκευασιών της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA ως προς την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση αφλατοξίνης M₁ σε γάλα μέσω της συγκριτικής αξιολόγησης παραμέτρων»

ΣΟΦΙΑ ΘΕΟΦΥΛΑΚΤΟΥ ΧΡΙΣΤΟΦΟΡΙΔΟΥ

Κτηνιάτρος Α.Π.Θ.

Λάρισα, 2011

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ-ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ
ΠΟΙΟΤΗΤΑ & ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ - ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ»



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Αξιολόγηση εμπορικών συσκευασιών της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA ως προς την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση αφλατοξίνης M₁ σε γάλα μέσω της συγκριτικής αξιολόγησης παραμέτρων»

ΣΟΦΙΑ ΘΕΟΦΥΛΑΚΤΟΥ ΧΡΙΣΤΟΦΟΡΙΔΟΥ

Κτηνίατρος Α.Π.Θ.

Λάρισα, 2011

Η Τριμελής Επιτροπή:

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

**Γκορτζή Όλγα
Επίκουρος Καθηγήτρια
Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων
ΤΕΙ Λάρισας**

Μέλη Τριμελούς Επιτροπής:

**Χατζηχριστοδούλου Χρήστος
Αναπληρωτής Καθηγητής
Τμήμα Ιατρικής
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

**Τσακάλωφ Ανδρέας
Επίκουρος Καθηγητής
Τμήμα Ιατρικής
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

...στους γονείς μου

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Αξιολόγηση εμπορικών συσκευασιών της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA ως προς την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση αφλατοξίνης M_1 σε γάλα μέσω της συγκριτικής αξιολόγησης παραμέτρων»

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στις μέρες μας, περισσότερο από ποτέ, τα ασφαλή τρόφιμα αποτελούν ζητούμενο για τη διασφάλιση της υγείας του καταναλωτή. Τόσο η επιβίωση των παθογόνων μικροοργανισμών όσο και η παρουσία τοξικών ουσιών στα τρόφιμα αποτελούν κίνδυνο για τη Δημόσια Υγεία.

Οι μυκοτοξίνες, μια ομάδα χημικών ενώσεων που παράγονται κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης των μυκήτων ως δευτερογενή προϊόντα του μεταβολισμού τους, κρίνονται ιδιαίτερα σημαντικές για τη Δημόσια Υγεία καθώς η κατανάλωσή τους επιφέρει θανατηφόρες ασθένειες ή μακροχρόνιες τοξικές επιπτώσεις στον ανθρώπινο οργανισμό. Μία ομάδα μυκοτοξινών αποτελούν και οι αφλατοξίνες. Από αυτές, οι αφλατοξίνες M_1 (AFM₁) και M_2 (AFM₂), που αποτελούν τους υδροξυλιωμένους μεταβολίτες των αφλατοξινών B_1 και B_2 αντίστοιχα, μπορούν να βρεθούν στο γάλα ζώων που κατανάλωσαν μολυσμένη τροφή καθώς και στα παραγόμενα γαλακτοκομικά προϊόντα. Η παρουσία της αφλατοξίνης M_1 σε γάλα που προορίζεται για άμεση κατανάλωση ή για χρήση στην παρασκευή διαφόρων προϊόντων γάλακτος αποτελεί κίνδυνο για τη δημόσια υγεία, αφού η συγκεκριμένη μυκοτοξίνη σύμφωνα με πρόσφατες βιβλιογραφικές αναφορές, έχει ανοσοκατασταλτική, μεταλλαξιογόνο, τερατογόνο και καρκινογόνο επίδραση στην ανθρώπινη υγεία. Δεδομένου ότι το γάλα αποτελεί μία από τις σημαντικότερες τροφές και το κυριότερο θρεπτικό συστατικό για την ανάπτυξη των νεαρών ατόμων και θα πρέπει να υφίσταται συχνότερο έλεγχο για την παρουσία καταλοίπων AFM₁.

Το συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για την παραγωγή ποιοτικών, υγιεινών και ασφαλών τροφίμων με απώτερο στόχο τη διασφάλιση της δημόσιας υγείας οδήγησε στην εφαρμογή πολλών μεθόδων ελέγχου και πρόληψης των πιθανών κινδύνων στα τρόφιμα. Για την ανίχνευση της αφλατοξίνης M_1 οι μέθοδοι που βρίσκουν συχνή εφαρμογή είναι η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), η υγρή χρωματογραφία (LC), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) συνδυασμένη με ανιχνευτή φθορισμού ή φασματομετρία μαζών (MS) και η ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA.

Από τις εφαρμοζόμενες μεθόδους ευρεία χρήση διαθέτει η μέθοδος ELISA καθώς θεωρείται αρκετά εύκολη στην εφαρμογή, ευαίσθητη, γρήγορη και φθηνή ενώ δεν απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε εργαστηριακές αναλύσεις ελέγχου διαλογής ή όταν απαιτείται η ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης είναι η αξιολόγηση των διαφόρων εμπορικών συσκευασιών της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA – ELISA kit – ως προς το βαθμό της της ειδικότητας και του ποσοστού ανάκτησης κατά την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της αφλατοξίνης M_1 στο γάλα. Για το σκοπό αυτό, ως αρχικό δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 2 λίτρα αίγειου γάλακτος, τα οποία ελήφθησαν από τη βιομηχανία γάλακτος «ΔΕΛΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ Α.Ε.» περιοχής Συδινής Ν. Ξάνθης και εστάλησαν σε

διαπιστευμένο εργαστήριο για εξέταση και προσδιορισμό της συγκέντρωσης της AFM₁ με τη μέθοδο αναφοράς HPLC. Η συγκέντρωση AFM₁ που ανιχνεύθηκε ήταν 5ng/kg. Το δείγμα διαιρέθηκε σε 11 ισόποσα υποδείγματα από τα οποία το ένα αποτέλεσε τον μάρτυρα-blank. Στα 5 πρώτα υποδείγματα πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός AFM₁ σε συγκεντρώσεις 12.5, 25, 50, 75 και 100 ng/kg. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων αξιολογήθηκαν με τη χρήση τριών διαφορετικών εμπορικών συσκευασιών της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA συγκριτικά με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά επίδοσης. Εν συνεχεία, τα επόμενα 5 υποδείγματα εμβολιάστηκαν με AFM₁ σε συγκεντρώσεις 12,5, 25, 50, 75 και 100 ng/kg και AFM₂ στις ίδιες αντίστοιχα συγκεντρώσεις για τον έλεγχο της ειδικότητας της μεθόδου για την ποσοτικοποίηση της AFM₁ παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων της AFM₂. Όλο το πείραμα διεξήχθη εις διπλούν.

Από τα αποτελέσματα που λάβαμε, διαπιστώσαμε ότι το kit «Α» επέδειξε για όλες τις εξεταζόμενες παραμέτρους και για όλες τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις, πλην της μικρότερης και της μεγαλύτερης, ικανοποιητική ακρίβεια και επαναληψιμότητα και σχετικά καλή εξειδίκευση. Συγκρίσιμα αποτελέσματα στην ακρίβεια και την επαναληψιμότητα επέδειξε και το kit «Β», αλλά μόνο σε περιοχές γύρω από το MRL, ενώ στις υπόλοιπες υπάρχει ξεκάθαρη υποτίμηση με στατιστικές διαφορές από το kit «Α» με επίπεδο εμπιστοσύνης 95%. Τέλος, το kit «Γ» επέδειξε τη μικρότερη ακρίβεια με ικανοποιητική επαναληψιμότητα και εξειδίκευση. Ωστόσο, οι μη ικανοποιητικές τιμές ακρίβειας δεν το καθιστούν απολύτως αξιόπιστο για την ποσοτικοποίηση της AFM₁ σε περιοχές κοντά στο MRL.

Λαμβάνοντας υπόψη την πιθανή αύξηση των συγκεντρώσεων της AFM₁ (Prandini *et al.*, 2009) κατά την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων απαιτείται θέσπιση ορίων και επέκταση αναλύσεων ελέγχου σε δείγματα γαλακτοκομικών προϊόντων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	I
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ ΠΙΝΑΚΩΝ	III
A. Πίνακες θεωρητικού μέρους	III
B. Πίνακες πειραματικού μέρους	III
C. Πίνακες επεξεργασίας αποτελεσμάτων	III
D. Πίνακες συγκριτικής επεξεργασίας αποτελεσμάτων	IV
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ ΕΙΚΟΝΩΝ	V
A. Εικόνες θεωρητικού μέρους	V
B. Εικόνες πειραματικού μέρους	V
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	V
A. Διαγράμματα επεξεργασίας αποτελεσμάτων	V
ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ	VI
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1.1. ΜΥΚΗΤΕΣ ΚΑΙ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ	1
1.2. ΜΥΚΗΤΕΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ	4
1.2.1. <i>Aspergillus flavus</i> και <i>Aspergillus parasiticus</i>	4
1.3. ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ	9
1.3.1. Εισαγωγικά στοιχεία και δομή	9
1.3.2. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά	11
1.3.3. Μέθοδοι αδρανοποίησης αφλατοξινών	12
1.4. ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ Μ ₁	17
1.4.1. Βιομετατροπή AFB ₁ σε AFM ₁	17
1.4.2. Τοξικότητα	23
1.4.2.1. Μελέτες σε ζώα	23
1.4.2.2. Μελέτες στην υγεία των ανθρώπων	24
1.4.3. Επιδημιολογικά δεδομένα	25

1.5. ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ	27
1.6. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ	31
1.6.1. Εισαγωγή	31
1.6.2. Χρωματογραφικές μέθοδοι	32
1.6.3. ELISA (Enzyme linked immuno-sorbent assay)	34
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	39
2.1. Επιλογή δείγματος	39
2.2. Προκατεργασία δειγμάτων	43
2.3. Υλικά	45
2.4. Πρωτόκολλο	47
3. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	49
4. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	53
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	53
ΑΚΡΙΒΕΙΑ	54
ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ	60
ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ	61
ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ-ΠΕΡΙΟΧΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ	64
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	66
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	69
7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	75

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα ιδιαιτέρως να ευχαριστήσω:

- Την κυρία Γκορτζή Όλγα, επίκουρο καθηγήτρια του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΤΕΙ Λάρισας και επιβλέπουσα καθηγήτρια της παρούσας εργασίας για την επιστημονική της καθοδήγηση καθώς και την υποστήριξη και ενθάρρυνση σε κάθε προσπάθεια κατά τη συνολική διάρκεια εκπόνησης της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης.
- Τα δύο μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, τον κύριο Χατζηχριστοδούλου Χρήστο, αναπληρωτή καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και τον κύριο Τσακάλωφ Ανδρέα, επίκουρο καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την πολύ καλή συνεργασία που είχαμε όλο το διάστημα της εκπόνησης του πειράματος.
- Την κα Μαλισσιόβα Ελένη, καθηγήτρια εφαρμογών ΤΕΙ Λάρισας, για την πολύτιμη καθοδήγηση και την αμέριστη βοήθεια που προσέφερε σε όλα τα στάδια του πειραματισμού.
- Τη βιομηχανία γάλακτος «ΔΕΛΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ Α.Ε.» περιοχής Συδινής Νομού Ξάνθης για τη δωρεάν παροχή του δείγματος του γάλακτος χωρίς το οποίο θα ήταν αδύνατη η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.
- Τον κο Μπαλτόπουλο Βασίλειο, κτηνίατρο του Τμήματος Κτηνιατρικής της Δ/σης Αγροτικής Οικονομίας & Κτηνιατρικής Περιφερειακής Ενότητας Ξάνθης, του οποίου η συμβολή στην ανεύρεση του δείγματος υπήρξε ουσιαστική.

- Τις εταιρείες «Biospectrum», «Biotica», «Adams», «Atropos» και «Food Laboratory Allergens» για την προσφορά των εμπορικών συσκευασιών της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ ΠΙΝΑΚΩΝ

A. Πίνακες θεωρητικού μέρους		
A/A	ΤΙΤΛΟΣ ΠΙΝΑΚΑ	ΣΕΛ.
1.	Οι σημαντικότερες μυκοτοξίνες και τα είδη των μυκήτων που ευθύνονται για την παραγωγή τους.	2
2.	Όρια ανάπτυξης και παραγωγής αφλατοξίνης του <i>A. flavus</i> .	5
3.	Όρια ανάπτυξης και παραγωγής αφλατοξίνης του <i>A. parasiticus</i> .	5
4.	Επίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου στη συγκέντρωση της AFM ₁ στο γάλα.	14
5.	Επίδραση της θερμότητας σε συνάρτηση με τον χρόνο στη συγκέντρωση της AFM ₁ στο γάλα.	15
6.	Μείωση της AFM ₁ στο γάλα χρησιμοποιώντας συνδυασμό θερμικής επεξεργασίας και H ₂ O ₂ .	15
7.	Εποχιακή διακύμανση των συγκεντρώσεων της AFM ₁ σε παραδοσιακά προϊόντα του Ιράν.	20
8.	Ποσοστά μόλυνσης γάλακτος με AFM ₁ όπως προέκυψαν από συγκριτικές μελέτες σε διάφορες χώρες του κόσμου.	21
9.	Παρουσία της AFM ₁ σε παστεριωμένο, νωπό, UHT και συμπυκνωμένο γάλα.	28
10.	Ανώτερα επιτρεπόμενα νομοθετικά όρια σχετικά με τη συγκέντρωση της AFM ₁ στο γάλα και τα προϊόντα του.	30
11.	Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα μεθόδων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης αφλατοξινών.	37
B. Πίνακες πειραματικού μέρους		
A/A	ΤΙΤΛΟΣ ΠΙΝΑΚΑ	ΣΕΛ.
12.	Περιεκτικότητα αίγιου και βόειου γάλακτος σε λιπαρά οξέα (g/100g γάλακτος).	39
13.	Μέση περιεκτικότητα σε βιταμίνες σε βόειο, αίγιο και ανθρώπινο γάλα.	40
C. Πίνακες επεξεργασίας αποτελεσμάτων		
A/A	ΤΙΤΛΟΣ ΠΙΝΑΚΑ	ΣΕΛ.
14.	Συγκεντρώσεις προτύπων διαλυμάτων (ng/l) των εταιρειών «Α», «Β» και «Γ».	49
15.	Λόγος B/Bo για τις εταιρείες «Α», «Β» και «Γ».	50

D. Πίνακες συγκριτικής επεξεργασίας αποτελεσμάτων

A/A	ΤΙΤΛΟΣ ΠΙΝΑΚΑ	ΣΕΛ.
16	Υπολογισμός μέσου όρου πειραματικών τιμών, τυπικής απόκλισης, σφάλματος τυπικής απόκλισης και σχετικής τυπικής απόκλισης επί τοις εκατό για τις εταιρείες «Α», «Β» και «Γ».	54
17.	Εκατοστιαίο ολικό σφάλμα ως προς τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης AFM_1 στα δείγματα.	56
18.	% Ανάκτηση εταιρειών «Α», «Β» και «Γ» ως προς τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της AFM_1 .	57
19.	Τιμές t_{exp} των εμπορικών σκευασμάτων των τριών εταιρειών.	58
20.	Τιμές επαναληψιμότητας.	60
21.	Υπολογισμός μέσου όρου πειραματικών τιμών, τυπικής απόκλισης, σφάλματος τυπικής απόκλισης και σχετικής τυπικής απόκλισης επί τοις εκατό για τις εταιρείες «Α», «Β» και «Γ» μετά την προσθήκη της AFM_2 .	61
22.	Εκατοστιαίο ολικό σφάλμα ως προς τον προσδιορισμό της AFM_1 στα δείγματα παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AFM_2 .	62
23.	% Ανάκτηση εταιρειών «Α», «Β» και «Γ» ως προς τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων AFM_1 στα δείγματα παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AFM_2 .	63
24.	Τιμές επαναληψιμότητας μετά την προσθήκη της AFM_2 .	63
25.	Διαφορά ποσοστών ανάκτησης παρουσία και απουσία AFM_2 στα δείγματα.	64
26.	Συνοπτική παρουσίαση των χαρακτηριστικών ποιότητας των εταιρειών «Α», «Β» και «Γ».	65

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ ΕΙΚΟΝΩΝ

<i>A. Εικόνες θεωρητικού μέρους</i>		
<i>A/A</i>	<i>ΤΙΤΛΟΣ ΕΙΚΟΝΑΣ</i>	<i>ΣΕΛ.</i>
1.	Δομή CPA.	6
2.	Χημικοί τύποι των σημαντικότερων αφλατοξινών.	9
3.	Στάδια μεταβολισμού της AFB ₁ και παράγοντες αδρανοποίησής της.	18
4.	Σχηματική αναπαράσταση σταδίων έμμεσης ανταγωνιστικής ELISA.	36
5.	Στάδια sandwich ELISA.	37
<i>B. Εικόνες πειραματικού μέρους</i>		
<i>A/A</i>	<i>ΤΙΤΛΟΣ ΕΙΚΟΝΑΣ</i>	<i>ΣΕΛ.</i>
6.	Γενικό σχήμα ποσοτικού προσδιορισμού με τη μέθοδο ELISA sandwich.	47

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

<i>A. Διαγράμματα επεξεργασίας αποτελεσμάτων</i>		
<i>A/A</i>	<i>ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΟΣ</i>	<i>ΣΕΛ.</i>
1.	Πρότυπη καμπύλη εταιρείας «Α».	51
2.	Πρότυπη καμπύλη εταιρείας «Β».	51
3.	Πρότυπη καμπύλη εταιρείας «Γ».	52

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

ΣΥΝΤΜΗΣΗ	ΑΓΓΛΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ
AFB ₁	Aflatoxin B ₁	Αφλατοξίνη B ₁
AFB ₂	Aflatoxin B ₂	Αφλατοξίνη B ₂
AFG ₁	Aflatoxin G ₁	Αφλατοξίνη G ₁
AFG ₂	Aflatoxin G ₂	Αφλατοξίνη G ₂
AFM ₁	Aflatoxin M ₁	Αφλατοξίνη M ₁
AFM ₂	Aflatoxin M ₂	Αφλατοξίνη M ₂
AFH ₁	Aflatoxin H ₁	Αφλατοξίνη H ₁
AFP ₁	Aflatoxin P ₁	Αφλατοξίνη P ₁
AFQ ₁	Aflatoxin Q ₁	Αφλατοξίνη Q ₁
AFL-A	Aflatoxicol-A	Αφλατοξικόλη-A
AFL-B	Aflatoxicol-B	Αφλατοξικόλη-B
GST	Glutathione-S-transferase	Γλουταθειονίνη-S-τρανσφεράση
PUFA	Polyunsaturated fatty acid	Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
MUFA	Monounsaturated fatty acid	Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα
SAFA	Saturated fatty acid	Κορεσμένα λιπαρά οξέα
MCT	Medium-chain triglycerides	Τριγλυκερίδια μέσης αλύσου
HSCAS	Hydrated sodium calcium aluminosilicate	Ένυδρο αργυλοπιριτικό υδροξείδιο του ασβεστίου
CPA	Cyclopiazonic acid	Κυκλοπιαζονικό οξύ

TFA	Trifluoroacetic acid	Τριφλουροοξικό οξύ
UHT milk	Ultra High Temperature Processing milk	Αποστειρωμένο γάλα μακράς διάρκειας
UV light	Ultra violet light	Υπεριώδες φως
DNA	Deoxyribonucleic acid	Δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ
RNA	Ribonucleic acid	Ριβονουκλεϊκό οξύ
mRNA	Messenger Ribonucleic acid	Αγγελιαφόρο Ριβονουκλεϊκό οξύ
HBV	Hepatitis B Virus	Ιός Ηπατίτιδας Β
ppm	parts per million	Μέρη στο εκατομμύριο
ppb	parts per billion	Μέρη στο δισεκατομμύριο
ppt	parts per trillion	Μέρη στο τρισεκατομμύριο
µg	microgram	Μικρογραμμάριο
mg	milligram	Χιλιοστόγραμμα
ng/l	nanogram/litre	Νανογραμμάριο/λίτρο
IU	International Units	Διεθνείς μονάδες
HPLC	High-Performance liquid chromatography	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
TLC	Thin-Layer chromatography	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας
HPTLC	High-Performance Thin-Layer chromatography	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης λεπτής στιβάδας
LC	Liquid chromatography	Υγρή χρωματογραφία

MS	Mass spectrometry	Φασματομετρία μαζών
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	Ενζυμοσύνδετη ανοσολογική δοκιμή
WHO	World Health Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
U.S. C.D.C.	United States Centers for Disease Control and Prevention	Κέντρο ελέγχου και πρόληψης νοσημάτων Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής
FDA	Food and Drugs Administration	Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων
IARC	International Agency for Research on Cancer	Διεθνής Οργανισμός Ερευνών για τον Καρκίνο
CFP	Conference for Food Protection	Συνέδριο για την προστασία των τροφίμων
EFSA	European Food Safety Authority	Ευρωπαϊκή Αρχή για την ασφάλεια των τροφίμων
FEEDAP	Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed	Ανώτατο Συμβούλιο για τα πρόσθετα και τα προϊόντα ή τις ουσίες που χρησιμοποιούνται στις ζωοτροφές
CE	European Commission	Ευρωπαϊκή Επιτροπή
EE	European Union	Ευρωπαϊκή Ένωση
H.P.A.		Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής
Ag	Antigen	Αντιγόνο
MRL	Maximum Residue Limit	Ανώτατο Επιτρεπόμενο Όριο
SEM	Standard Error of the Mean	Τυπική απόκλιση μέσης τιμής
SD	Standard Deviation	Τυπική απόκλιση

STD	Diluted Standard	Πρότυπο Διάλυμα
M.O.		Μέσος όρος
RSD	Relative Standard Deviation	Σχετική τυπική απόκλιση
%RSD	% Relative Standard Deviation	Σχετική τυπική απόκλιση επί τοις εκατό
R	Repeatability	Επαναληψιμότητα
%R	%Recovery	%Ανάκτηση
T	Total error	Ολικό σφάλμα
LOD	Limit of detection	Όριο ανίχνευσης
LOQ	Limit of Quantitation	Όριο ποσοτικοποίησης
CV	Coefficient of Variation	Συντελεστής Μεταβλητότητας

1.1. ΜΥΚΗΤΕΣ ΚΑΙ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

Οι μύκητες είναι μικροοργανισμοί που είναι είτε σαπροφυτικοί, καθώς αναπτύσσονται σε νεκρή οργανική ύλη, ή πιο συνηθέστερα παρασιτικοί, καθώς επιβιώνουν σε άλλους ζωντανούς οργανισμούς. Ανάλογα με τη δράση τους διακρίνονται σε ωφέλιμους και βλαβερούς μύκητες. Οι ωφέλιμοι μύκητες έχουν μεγάλη οικονομική σημασία για τη βιομηχανία των τροφίμων καθώς συμμετέχουν ευρύτατα στις διαδικασίες των ζυμώσεων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτών αποτελούν ο *Saccharomyces cerevisiae*, που χρησιμοποιείται στην αρτοποιία, την οينوποιία και τη ζυθοποιία για την παραγωγή του ψωμιού, του κρασιού και της μπίρας αντίστοιχα, οι μύκητες του γένους *Penicillium spp.*, που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή και την ωρίμαση των μπλε τυριών και του Camembert προσδίδοντας τους παράλληλα το ξεχωριστό άρωμα και τη γεύση που τα κάνει τόσο ελκυστικά και νόστιμα και οι μύκητες του γένους *Mucor spp.*, που παράγουν την πυτιά, η οποία χρησιμοποιείται στην πήξη του γάλακτος για την παραγωγή τυριών. Ωστόσο, υπάρχουν και κάποιοι μύκητες, όπως οι μύκητες του γένους *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum* κ.ά που μπορεί να καταστρέψουν αποθηκευμένα τρόφιμα και άλλα υλικά μεγάλης οικονομικής σημασίας. Επίσης, μπορούν να προκαλέσουν εκτεταμένες απώλειες καρπών καθώς και να θέσουν σε κίνδυνο τη Δημόσια υγεία μέσω της παραγωγής τοξικών ουσιών, που καλούνται μυκοτοξίνες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων μυκοτοξινών αποτελούν οι αφλατοξίνες με ισχυρή καρκινογόνο επίδραση, η T-2 τοξίνη που προκαλεί την τροφιμογενή τοξική αλευκία και η ωχρατοξίνη που οδηγεί σε τοξικότητα των νεφρών (Yousef & Carlstrom, 2003).

Οι μυκοτοξίνες είναι μια ομάδα χημικών ενώσεων που θεωρούνται προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού, τα οποία σχηματίζονται κατά το τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης του μύκητα και δεν παρουσιάζουν βιοχημική σημασία για την αύξηση ή την ανάπτυξη του (Smith & Anderson, 1991). Είναι ετεροκυκλικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους με ποικίλες χημικές δομές και βιολογικές δραστηριότητες. Οι μυκοτοξίνες παράγονται από σαπροφυτικούς και ενδοφυτικούς μύκητες κατά την αποθήκευση και ανάπτυξη των φυτών αντίστοιχα και επιδεικνύουν κατά κύριο λόγο λιπόφιλο χαρακτήρα με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται στους λιπώδεις ιστούς των

φυτών και των ζώων (Eaton & Groopman, 1994). Οι μυκοτοξίνες μπορούν να παραχθούν ως αποτέλεσμα μυκητιακής προσβολής των φυτών είτε κατά την καλλιέργειά τους είτε κατά την αποθήκευση. Ωστόσο, δεν υπάρχει καλή συσχέτιση ανάμεσα στο επίπεδο της μυκητιακής μόλυνσης και το επίπεδο των μυκοτοξινών που παράγεται στα μολυσμένα φυτά. Η αποτυχία εντοπισμού ορατών μυκηλίων ενός συγκεκριμένου τοξικού είδους σε φρέσκα ή αποθηκευμένα προϊόντα δεν αποτελεί ασφαλή ένδειξη ότι η μυκοτοξίνη είναι απύσχα, αλλά ούτε και η εμφάνιση αυτών των μυκήτων πιστοποιεί την παραγωγή μυκοτοξινών από αυτούς. Επομένως, τα χαρακτηριστικά αυτής της τάξης των τοξινών είναι ότι ορισμένες παράγονται συχνά μόνο από συγκεκριμένα είδη, και τα επίπεδα της παραγωγής ποικίλουν όχι μόνο μεταξύ των διαφόρων στελεχών του είδους, αλλά και σε αναφορά με τις περιβαλλοντικές συνθήκες και το κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα (Nielsen, 1998). Στον πίνακα 1 παρατίθενται ορισμένες μυκοτοξίνες και τα είδη των μυκήτων που ευθύνονται για τον σχηματισμό τους.

Πίνακας 1: Οι σημαντικότερες μυκοτοξίνες και τα είδη των μυκήτων που ευθύνονται για την παραγωγή τους.

Είδος μυκοτοξίνης	Υπεύθυνος μύκητας
Αφλατοξίνες	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Aspergillus nomius</i>
Ωχροτοξίνη	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Aspergillus niger</i> var. <i>niger</i> , <i>Penicillium verrucosum</i>
Κυκλοπιαζονικό οξύ	<i>Aspergillus flavus</i>
Φουμονισίνες	<i>Fusarium proliferatum</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Fusarium subglutinans</i>
Τριχοθεκίνες	<i>Fusarium</i> spp.
T-2 τοξίνη	<i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>Fusarium poae</i>
Δεοξυνιβαλενόλη	<i>Fusarium graminearum</i>
Ζεαραλενόνη	<i>Fusarium culmorum</i> , <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium crookwellense</i>
Μονιλοφορμίνη	<i>Fusarium proliferatum</i> , <i>Fusarium subglutinans</i>
Πατουλίνη	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Aspergillus clavatus</i>

Πηγή: (Downes & Ito, 2001)

Οι επιπτώσεις των μυκοτοξινών στην υγεία των ανθρώπων και των ζώων είναι ανυπολόγιστες. Δρουν είτε άμεσα προκαλώντας ταχείες και θανατηφόρες ασθένειες είτε μακροχρόνια επιφέροντας μακροχρόνιες τοξικές επιπτώσεις (Eaton & Groopman, 1994). Οι μυκοτοξίνες σχηματίζονται από μύκητες που αναπτύσσονται στα προϊόντα φυτικής προέλευσης όπως τα δημητριακά και ιδιαίτερα το καλαμπόκι, το σιτάρι, οι ελαιόσποροι, ο βαμβακόσπορος, τα φυστίκια και τα φρούτα (σύκα, σταφίδες, μπανάνες, μήλα κ.ά.) προπάντων όταν αυτά αποθηκεύονται σε συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας και θερμοκρασίας (Βάσσος, 2004). Ο άνθρωπος και τα ζώα εκτίθενται στις μυκοτοξίνες κυρίως μέσω των τροφίμων και των ζωοτροφών αντίστοιχα, καθώς τα τρόφιμα και οι ζωοτροφές μπορούν να αποτελέσουν ιδεατό υπόστρωμα για την ανάπτυξη μυκήτων και την παραγωγή μυκοτοξινών. Επιπλέον, εξαιτίας της σχετικής σταθερότητάς τους στη θέρμανση και σε άλλου είδους χειρισμούς δύνανται να παραμείνουν σε αυτά για μεγάλο χρονικό διάστημα (Eaton & Groopman, 1994).

1.2. ΜΥΚΗΤΕΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ

1.2.1. *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus*

Το γένος *Aspergillus* έχει περιγραφεί εδώ και 300 χρόνια, και ανέκαθεν θεωρείται ένα πολύ σημαντικό γένος μυκήτων. Περιλαμβάνει 100 ή περισσότερα αναγνωρισμένα είδη, πολλά από τα οποία αναπτύσσονται και σπορογονούν ικανοποιητικά σε συνθετικά και ημισυνθετικά υποστρώματα (Roberts *et al.*, 1996).

Οι αφλατοξίνες παράγονται από τέσσερα είδη του γένους *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* και *A. tamarii*. Μόνο οι μύκητες *A. flavus* και *A. parasiticus* εμφανίζουν σημασία στον αγροτικό τομέα και επομένως αυτοί οι δύο οργανισμοί αποτελούν τους μόνους που χρησιμοποιούνται στη μελέτη της βιοσύνθεσης των αφλατοξινών με τον *A. flavus* να αποτελεί το κυρίαρχο είδος στις ευρέως μολυσμένες περιοχές (Payne & Brown, 1998).

Οι *A. flavus* και *A. parasiticus* είναι μύκητες που ανευρίσκονται παντού με μεγαλύτερη προτίμηση για την ανάπτυξή τους στους ελαιώδεις καρπούς. Δημιουργούν αποικίες σε καρπούς που αναπτύσσονται σε κλίματα τροπικά ή υποτροπικά, αλλά και καρπούς μετά το στάδιο της συγκομιδής τους εφόσον δεν έχουν υποστεί πλήρη αφυδάτωση. Η θερμοκρασία ανάπτυξης αυτών των μυκήτων είναι 12-48°C, ενώ οι ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης κυμαίνονται στους 36-38°C. Η παραγωγή των αφλατοξινών παρατηρείται όταν οι θερμοκρασίες κυμαίνονται μεταξύ 20 και 30°C. Οι μύκητες αυτοί μπορούν να επιβιώσουν στο έδαφος και τα υπολείμματα καρπών και όταν οι συνθήκες είναι κατάλληλες παράγουν σπόρια που διασπείρονται με τον άνεμο. Ο *A. parasiticus* προτιμά το περιβάλλον του εδάφους και εμφανίζεται συχνότερα στα φυστίκια ενώ ο *A. flavus* έχει προσαρμοστεί καλύτερα στο αέριο περιβάλλον και αποτελεί το κυρίαρχο πρόβλημα στα ξηρά φρούτα, το βαμβάκι και τον αραβόσιτο (Prandini *et al.*, 2009). Σε γενικές γραμμές ο μύκητας αυτός δημιουργεί αποικίες σε καρπούς με κατεστραμμένους πυρήνες, αν και η ικανότητά του να παράγει ένζυμα όπως την πεκτινάση και την κουτινάση, του επιτρέπει να διεισδύει και σε μη κατεστραμμένους καρπούς. Η υγρασία του πυρήνα αποτελεί εμπόδιο για την ανάπτυξη του μύκητα και την παραγωγή τοξίνης μόνο όταν ενδεικτικά κυμαίνεται στο 13% με τιμή της a_w : 0,78 (Prandini *et al.*, 2009).

Στους πίνακες 2 και 3 δίνονται τα όρια ανάπτυξης (ελάχιστο, βέλτιστο και μέγιστο όριο) των μυκήτων *A. flavus* και *A. parasiticus* αντίστοιχα καθώς και οι συνθήκες παραγωγής των αφλατοξινών τους.

Πίνακας 2: Όρια ανάπτυξης και παραγωγής αφλατοξίνης του *A. flavus*

	Ελάχιστο	Βέλτιστο	Μέγιστο
Ανάπτυξη μύκητα			
Θερμοκρασία (°C)	10-12	33	43
a _w	0,8	0,98	>0,99
pH	2	5-8	>11
Παραγωγή αφλατοξίνης			
Θερμοκρασία (°C)	13	16-31	31-37
a _w	0,82	0,95-0,99	>0,99

Πηγή: (Roberts et al., 1996)

Πίνακας 3: Όρια ανάπτυξης και παραγωγής αφλατοξινών του *A. parasiticus*.

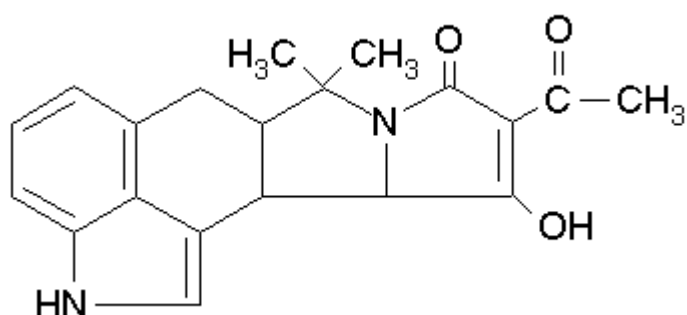
	Ελάχιστο	Βέλτιστο	Μέγιστο
Ανάπτυξη μύκητα			
Θερμοκρασία (°C)	12	32	42
a _w	0,80-0,83	0,99	>0,99
pH	2	5-8	>11
Παραγωγή αφλατοξίνης			
Θερμοκρασία (°C)	12	25	40
a _w	0,86-0,87	0,95	>0,99
pH	2	6	>8

Πηγή: (Roberts et al., 1996)

Ο *Aspergillus flavus* ευθύνεται για την παραγωγή μόνο των αφλατοξινών B₁ και B₂ και του κυκλοπιαζονικού οξέος, αν και μόνο ένα ποσοστό των στελεχών του είναι τοξικό. Ο *Aspergillus parasiticus* παράγει τις αφλατοξίνες B₁, B₂, G₁ και G₂ χωρίς την παράλληλη

παραγωγή κυκλοπιαζονικού οξέος και σχεδόν όλα τα στελέχη του είναι τοξικά. Ο *Aspergillus nomius* μορφολογικά είναι παρόμοιος με τον *Aspergillus flavus* αλλά, όπως και ο *Aspergillus parasiticus*, παράγει αφλατοξίνες Β και G χωρίς κυκλοπιαζονικό οξύ (Doyle *et al.*, 1997).

Το κυκλοπιαζονικό οξύ (CPA) είναι ένα τοξικό τετραμικό οξύ ινδόλης (εικόνα 1), το οποίο αρχικά απομονώθηκε από το είδος *Penicillium cyclopium* και μεταγενέστερα από άλλα είδη του γένους *Penicillium* καθώς και τους μύκητες *Aspergillus flavus* και *Aspergillus versicolor*. Είναι μία άχρωμη, κρυσταλλική ουσία, διαλυτή στο χλωροφόρμιο, το διχλωρομεθάνιο, τη μεθανόλη, το ακετονιτρίλιο και το διττανθρακικό νάτριο. Έχει εντοπιστεί σε φυσικώς μολυσμένες ζωοτροφές, αραβόσιτο, φυστίκια, γάλα, τυρί και άλλα τρόφιμα. Είναι τοξικό μόνο όταν απαντά σε υψηλές συγκεντρώσεις. Συνήθως, η παρουσία του συνοδεύεται από την ταυτόχρονη παρουσία των αφλατοξινών με αποτέλεσμα, σε αυτές τις περιπτώσεις, να λειτουργεί συνεργιστικά ενισχύοντας το συνολικό τοξικό αποτέλεσμα των αφλατοξινών στον οργανισμό (Gilbert & Şenyuva, 2008).



Εικόνα 1: Δομή CPA (κυκλοπιαζονικό οξύ).

Πηγή: (www.fermentek.co.il/cyclopiazonic_acid.htm).

Τα κύρια όργανα-στόχοι του CPA είναι το ήπαρ, οι νεφροί και ο γαστρεντερικός σωλήνας. Στα πουλερικά και τα χοιροειδή το κυκλοπιαζονικό οξύ λειτουργεί κυρίως ως εντερονεφροτοξικό, ενώ στους επίμυες εμφανίζει κυρίως ηπατοτοξική δράση. Σε ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση σε επίμυες εμφανίζει νευροτοξική δράση με οπισθότονο, ενώ ταυτόχρονα προκαλεί βλάβη του ήπατος, των νεφρών, της σπλήνας και άλλων οργάνων. Κατάλοιπα του CPA μπορεί να βρεθούν στα αυγά, το κρέας και τα προϊόντα του καθώς και στο βούτυρο, την κρέμα και το τυρί που παρασκευάζονται από μολυσμένο γάλα γεγονός που οφείλεται στην ανθεκτικότητα του CPA και στη μερική

καταστροφή του με τις συνήθεις διαδικασίες επεξεργασίας των προϊόντων γάλακτος (Acamovic *et al.*, 2004).

Οι παράγοντες που επιδρούν στην παραγωγή των αφλατοξινών από τους μύκητες *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus* είναι:

- **Η θερμοκρασία**- η άριστη θερμοκρασία π.χ. για τον *Aspergillus flavus* είναι 37° C, ενώ για τις τοξίνες του κυμαίνεται από 7,5 έως 40°C.
- **Η υγρασία**- η ελάχιστη σχετική υγρασία για τη βλάστηση των μυκήτων είναι περίπου 80%. Για το λόγο αυτό, ζωοτροφές με υψηλό ποσοστό υγρασίας πρέπει πριν τη χρήση τους να οδηγούνται σε ειδικά ξηραντήρια.
- **Το φως**- γενικά οι μύκητες παράγουν μεγαλύτερη ποσότητα τοξινών σε απουσία φωτός.
- **Το pH**- το ιδανικό pH κυμαίνεται από 4 έως 4,6.
- **Το υπόστρωμα**- τα υποστρώματα που ευνοούν την παραγωγή αφλατοξινών είναι τα προϊόντα φυτικής προέλευσης (καλαμπόκι, βαμβακόσπορος, φυστίκια, κ.ά.), ενώ αντίθετα τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης είναι λιγότερο πιθανά υποστρώματα για την παραγωγή τους.
- **Το στέλεχος του μύκητα**- υπάρχουν είδη μυκήτων που ανήκουν στο ίδιο γένος ή και στελέχη του ίδιου είδους που είναι λιγότερο ή περισσότερο τοξικά. Επίσης είναι δυνατόν ένα είδος μύκητα να παράγει μια τοξίνη και έτερο είδος του ίδιου γένους άλλη.
- **Οι χημικές ουσίες**- πολλές από αυτές, όπως το NaCl, το σορβικό οξύ και τα άλατά του, η καφεΐνη, η θεοφυλλίνη κ.ά. έχουν μυκοστατική δράση, γιατί εμποδίζουν την ανάπτυξη του μύκητα και κατά συνέπεια την παραγωγή αφλατοξίνης. Μπαχαρικά όπως η κανέλλα και το γαρύφαλλο και χημικές ουσίες όπως η κιναμική αλδεϋδη και η ευγενόλη αναφέρεται ότι εμποδίζουν την ανάπτυξη μυκήτων (π.χ. *A. parasiticus*) και την παραγωγή αφλατοξίνης (Βάσσο, 2004).
- **Ο μικροβιακός ανταγωνισμός**- η παραγωγή των αφλατοξινών αναστέλλεται από τη συνύπαρξη οξεογαλακτικών βακτηρίων, όπως του *Bacillus subtilis* και

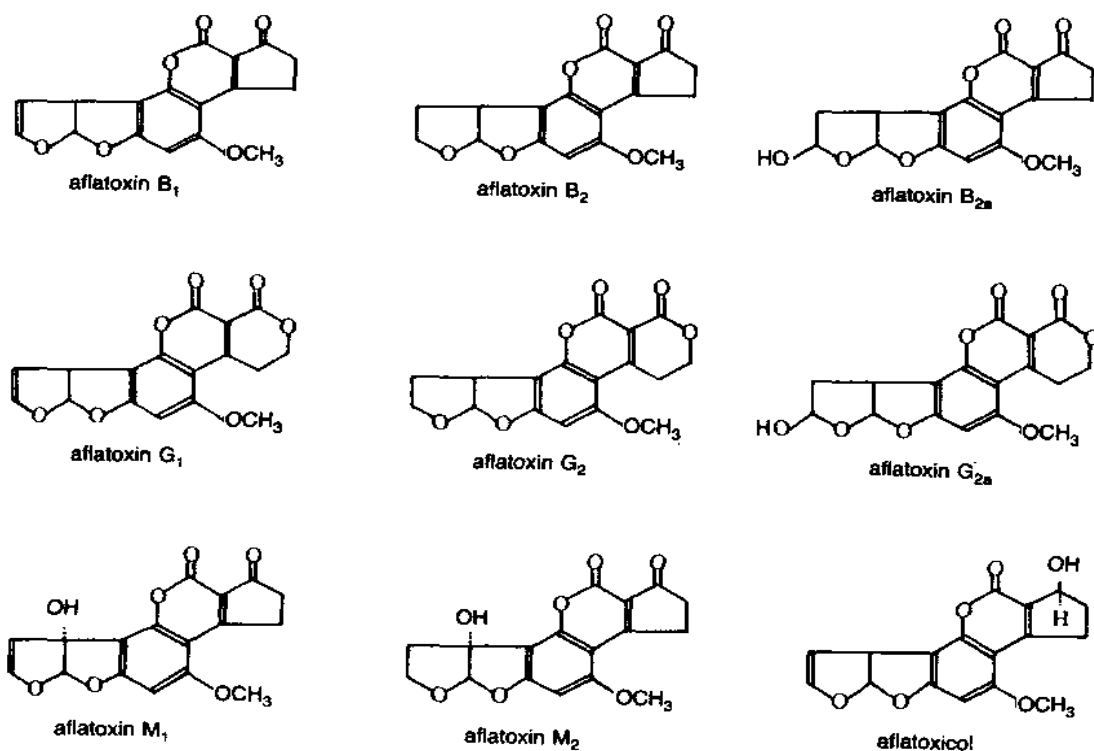
αρκετών μυκήτων. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στον ανταγωνισμό που εξελίσσεται ανάμεσά τους ως προς τον χώρο και τα θρεπτικά συστατικά καθώς και στην παραγωγή αντιφλατοξιγονικών μεταβολιτών από τους άλλους συνυπάρχοντες μικροοργανισμούς (Ruiquian et al., 2005).

1.3. ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ

1.3.1. Εισαγωγικά στοιχεία και δομή

Οι αφλατοξίνες αποτελούν τις πιο ευρέως μελετημένες μυκοτοξίνες στον κόσμο. Η γνώση της ύπαρξής τους χρονολογείται από το 1960, όταν περισσότερες από 100.000 νεαρές γαλοπούλες πέθαναν στην Αγγλία μετά από κατανάλωση φιστικιών που είχαν εισαχθεί από την Αφρική και τη Βόρεια Αμερική. Από τη μολυσμένη ζωοτροφή απομονώθηκε ο *Aspergillus flavus* και μία τοξίνη παραγόμενη από αυτόν τον μικροοργανισμό η οποία ονομάστηκε αφλατοξίνη, δηλαδή τοξίνη του *Aspergillus flavus* -Α-φλα-τοξίνη (Jay, 1996).

Στην εικόνα 2 παρουσιάζονται οι χημικοί τύποι των σημαντικότερων για τη Δημόσια Υγεία αφλατοξινών.



Εικόνα 2: Χημικοί τύποι των σημαντικότερων αφλατοξινών.

Πηγή: (www.fao.org).

Υπάρχουν τέσσερις τύποι αφλατοξινών που παράγονται από τους *Aspergillus flavus* και *A. parasiticus*. Οι αφλατοξίνες αυτές επονομάστηκαν G₁, G₂, B₁ και B₂ από το χρώμα του φθορισμού που δίνουν (G για το πράσινο-green και B για το μπλε-blue), ενώ οι δείκτες 1 και 2 αναφέρονται στις αποστάσεις μετακίνησής τους κατά τον διαχωρισμό τους στις πλάκες της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC). Οι αφλατοξίνες M₁ και M₂, που αποτελούν τις υδροξυλιωμένες μορφές των B₁ και B₂ αντίστοιχα, δεν παράγονται από τους ασπέργιλλους, αλλά παράγονται μέσω των μεταβολικών συστημάτων των ανθρώπων και των ζώων που έχουν καταναλώσει τις μη-υδροξυλιωμένες μορφές (Troller, 1993).

1.3.2. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

Χημικά οι αφλατοξίνες είναι φθορίζουσες ετεροκυκλικές ενώσεις που αποτελούνται από τμήματα διϋδροδιφουρανίου και τετραϋδροδιφουρανίου συγχωνευμένα στο μόριο της κουμαρίνης. Πιο αναλυτικά, οι χημικές και φυσικές ιδιότητες των πιο σημαντικών αφλατοξινών είναι:

Αφλατοξίνη B₁: C₁₇H₁₂O₆, μοριακό βάρος 312, σημείο τήξης 268-269°C, παρουσιάζει έντονο κυανό φθορισμό σε έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία στα 360 nm.

Αφλατοξίνη B₂: C₁₇H₁₄O₆, μοριακό βάρος 314, σημείο τήξης στους 286-289°C, παρουσιάζει έντονο κυανό φθορισμό σε έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία στα 360 nm.

Αφλατοξίνη G₁: C₁₇H₁₂O₇, μοριακό βάρος 328, σημείο τήξης στους 244-246°C, παρουσιάζει κυανοπράσινο φθορισμό σε έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία στα 360 nm.

Αφλατοξίνη G₂: C₁₇H₁₄O₇, μοριακό βάρος 328, σημείο τήξης στους 230°C, παρουσιάζει κυανοπράσινο φθορισμό σε έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία στα 360 nm (Hui *et al.*, 2001).

Αφλατοξίνη M₁: C₁₇H₁₂O₇, μοριακό βάρος 328, σημείο τήξης στους 299°C, παρουσιάζει κυανό-βιολετί φθορισμό σε έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία στα 357 nm.

Αφλατοξίνη M₂: C₁₇H₁₄O₇, μοριακό βάρος 330, σημείο τήξης στους 293°C, παρουσιάζει βιολετί φθορισμό σε έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία στα 357 nm (Deshpande, 2002).

Οι αφλατοξίνες δεν γίνονται αντιληπτές με την όσφρηση ή τη γεύση, παρουσιάζουν φθορισμό στο υπεριώδες φως και είναι ιδιαίτερα ανθεκτικές σε υψηλές θερμοκρασίες καθώς αντέχουν σε έκθεση πάνω από τους 320°C χωρίς να υποστούν διάσπαση. Οι συνήθεις τεχνικές επεξεργασίας τροφίμων, όπως ο βρασμός, η ζύμωση, η ψύξη, η κατάψυξη και η παστερίωση των τροφίμων δε δύνανται να τις καταστρέψουν (Izquierdo *et al.*, 2005).

1.3.3. Μέθοδοι αδρανοποίησης αφλατοξινών

Στις μέρες μας η ευαισθησία της κοινωνίας και το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για τις επιπτώσεις της κατανάλωσης τροφίμων στη Δημόσια Υγεία, συνέβαλαν στην ανεύρεση διαφόρων τρόπων αντιμετώπισης του φαινομένου. Στον αγρό, η ανάπτυξη των *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus* παρεμποδίζεται με την καλλιέργεια ανθεκτικών ποικιλιών και την εφαρμογή αγρονομικών πρακτικών από το στάδιο της φύτευσης έως το στάδιο της συγκομιδής και αποθήκευσης των καρπών. Η προφύλαξη των καρπών από την προσβολή των εντόμων και τους τραυματισμούς καθώς και η προστασία με την εφαρμογή χημικών ουσιών βελτιώνουν την ιδανική ανάπτυξη των φυτών. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, η χαμηλή υγρασία και θερμοκρασία, ο επαρκής αερισμός και ο έλεγχος των εντόμων-τροφικών αποτρέπουν την παραγωγή αφλατοξινών στους καρπούς. Σε συνθήκες σπιτιού, η κατάλληλη αποθήκευση των τροφίμων για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε χαμηλή υγρασία και θερμοκρασία αποτρέπει την ανάπτυξη των αφλατοξινών (Weidenbörner, 2001).

Εάν, ωστόσο, τα προληπτικά μέτρα αποτύχουν, η AFB₁ μπορεί να μειωθεί στις ζωοτροφές με άλεση ή με φυσική ή χημική επεξεργασία. Η φυσική κατεργασία των ζωοτροφών περιλαμβάνει τη θερμότητα, τα μικροκύματα, τις ακτίνες γ, τις ακτίνες X, την υπεριώδη ακτινοβολία και την προσρόφηση των αφλατοξινών σε HSCAS (hydrated sodium calcium aluminosilicate) και άλλα αδρανή υλικά, τεχνική που έχει κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία παραγωγής ζωοτροφών για τη μείωση της συγκέντρωσης της M₁ στο γάλα (Creppy, 2002).

Ο μεταβολισμός της AFB₁ στο εποξειδίο και την αφλατοξίνη M₁ μπορεί να παρεμποδιστεί *in vitro* (σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα) και *in vivo* (σε επίμυες) μέσω της επεξεργασίας τους με ένα αντισχιστοσωμιακό φάρμακο, την ολτιπράζη, η οποία παρεμποδίζει τον σχηματισμό του εποξειδίου και επάγει το κυριότερο ένζυμο αποτοξίνωσης των αφλατοξινών, τη γλουταθειονίνη-S-τρανσφεράση (GST). Στην παρούσα φάση, η ολτιπράζη βρίσκει εφαρμογή στις φάσεις I και II των κλινικών δοκιμών που διενεργούνται στην Κίνα για την πρόληψη του καρκίνου του ήπατος, ενώ τα αποτελέσματα αυτών των ερευνών θα βοηθήσουν στην διευκρίνιση του μεταβολισμού και του τρόπου δράσης των αφλατοξινών στους ανθρώπους (Creppy, 2002).

Η αποδόμηση των αφλατοξινών μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση πολλών βακτηρίων του εδάφους, όπως για παράδειγμα το *Flavobacterium aurantiacum* (NRRL B-184), ένα είδος βακτηρίου που βρίσκεται στο έδαφος και το νερό και μπορεί να απομακρύνει σε ικανοποιητικό βαθμό την αφλατοξίνη από ένα υγρό μέσο χωρίς την παραγωγή τοξικών παραπροϊόντων. Άλλοι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται κυρίως στην αποδόμηση της AFB₁ είναι η *Nocardia asteroides*, το *Corynebacterium rubrum*, το *Mycobacterium fluoranthenorans* sp. nov. DSM44556T και το *Rhodococcus erythropolis*, το οποίο συμμετέχει στην αποδόμηση των αφλατοξινών μέσω του ενζύμου υπεροξειδάση. Ακόμη, οι μύκητες *Aspergillus niger*, *Eurotium herbariorum*, *Rhizopus* sp., και το μη-αφλατοξινογόνο στέλεχος του *A. flavus* βρέθηκε ότι αποδομούν την αφλατοξίνη B₁ αρχικά σε AFL-A και AFL-B (18 φορές λιγότερο τοξικές σε σχέση με την AFB₁) και στη συνέχεια σε άλλους μη τοξικούς μεταβολίτες. Το πρωτόζωο *Tetrahymena pyriformis* μπορεί να μειώσει την συγκέντρωση της AFB₁ στο 25% μέσα σε 30 ώρες, ενώ ο *Pleurotus ostratus* και η *Armillariella tabescens* (E-20) μειώνουν τη συγκέντρωση της AFB₁ μέσω της παραγωγής ειδικών ενζύμων (CFP/EFSA/FEEDAP, 2009).

Επιπλέον, η αποσύνθεση των αφλατοξινών επιτυγχάνεται μετά από έκθεσή τους στο ηλιακό φως, ενώ η καταστροφή και η απομάκρυνσή τους από τα έλαια επιτυγχάνεται με την επίδραση διαφόρων αλκαλίων. Ωστόσο, η πιο επιτυχής μέθοδος αποδόμησης των αφλατοξινών θεωρείται η χρήση της αμμωνίας καθώς προστατεύει από την οξεία και την χρόνια αφλατοξίνωση στα ζώα. Η αμμωνία προκαλεί τη διάνοιξη του δακτυλίου της AFB₁ και την αποδόμησης της. Χρησιμοποιείται σε εμπορική κλίμακα για την απολύμανση των ζωοτροφών, όπως του καλαμποκιού, του φιστικιού και του βαμβακόσπορου σε Γαλλία, Σενεγάλη και Η.Π.Α.(Αριζόνα, Καλιφόρνια, Τζόρτζια, Αλαμπάμα) (Weidenbörner, 2001).

Η θερμική επεξεργασία που ξεπερνά τους 250°C είναι απαραίτητη προκειμένου να επιτευχθεί μία ικανοποιητική αποδόμηση των αφλατοξινών. Η αύξηση της υγρασίας του υποστρώματος ενισχύει την αποδόμηση αυτή (Weidenbörner, 2001). Κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και της αποθήκευσης, η περιεκτικότητα της AFM₁ στο γάλα δεν παραμένει σταθερή και ομοιογενής. Οι Purchhase, Steyn, Rinsma και Tustin (1972) ανακάλυψαν ότι η παστερίωση του γάλακτος στους 62°C για 30' μειώνει τα ποσοστά της AFM₁ κατά 32%. Ένα χρόνο αργότερα, ο McKinney και οι συνεργάτες του (1973) παρατήρησαν ότι μετά από 4 ημέρες συντήρησης του γάλακτος στους 0°C το 40% της

τοξίνης καταστρέφεται ενώ μετά από 6 ημέρες αδρανοποιείται περίπου το 80%. Επίσης, σε μελέτες των Heimbecher, Jorgensen & Price (1988) αναφέρθηκε μία μείωση της AFM₁ κατά 34% μετά από πάροδο 2 εβδομάδων στους 21°C (Kaniou-Grigoriadou *et al.*, 2005).

Τα οξειδωτικά μέσα όπως το όζον και το υπεροξείδιο του υδρογόνου έχουν αποδειχθεί αρκετά αποτελεσματικά στην απομάκρυνση των αφλατοξινών από τα φιστίκια. Παρόλο που το όζον ήταν αποτελεσματικό στην απομάκρυνση των αφλατοξινών B₁ και G₁ σε ταυτόχρονη έκθεση στους 100°C για 2 ώρες, δεν παρατηρήθηκε κανένα αποτέλεσμα σχετικά με την απομάκρυνση της αφλατοξίνης B₂, ενώ η όλη επεξεργασία μείωνε τη συγκέντρωση του αμινοξέος λυσίνη στο τελικό τρόφιμο. Η επεξεργασία με υπεροξείδιο του υδρογόνου συντέλεσε στην καταστροφή κατά 97% των αφλατοξινών στα φιστίκια (Doyle *et al.*, 1997).

Σχετικά με την αποδόμηση της AFM₁ στο γάλα, αποτελέσματα ερευνών έδειξαν ότι το υπεροξείδιο του οξυγόνου δεν έχει καμία επίδραση στη συγκέντρωσή της εάν δε συνοδεύεται από κατάλληλη θερμική επεξεργασία. Στους πίνακες 4, 5 και 6 αναφέρονται οι σχετικές μειώσεις της συγκέντρωσης της αφλατοξίνης M₁ στο γάλα με την εφαρμογή υπεροξειδίου του οξυγόνου, θέρμανσης και συνδυασμού των δύο μεθόδων αντίστοιχα.

Πίνακας 4: Επίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου στη συγκέντρωση της AFM₁ στο γάλα.

Συγκέντρωση H ₂ O ₂	% μείωσης της AFM ₁
0,125% H ₂ O ₂	0
0,250% H ₂ O ₂	1
0,50% H ₂ O ₂	0,7
1,0% H ₂ O ₂	0

Πηγή: (Aman, 1992)

Πίνακας 5: Επίδραση της θερμότητας σε συνάρτηση με τον χρόνο στη συγκέντρωση της AFM₁ στο γάλα.

Θερμική επεξεργασία	% μείωσης της AFM ₁
Στους 63°C για 30 min (P ₁)	0,8
Στους 75°C για 15 sec (P ₂)	0
Βρασμός για 5 min (P ₃)	4,3

Πηγή: (Aman, 1992)

Πίνακας 6: Μείωση της AFM₁ στο γάλα χρησιμοποιώντας συνδυασμό θερμικής επεξεργασίας και H₂O₂.

H ₂ O ₂	Θερμική επεξεργασία		
	P ₁	P ₂	P ₃
	% μείωσης της AFM ₁	% μείωσης της AFM ₁	% μείωσης της AFM ₁
0,125% H ₂ O ₂	7,7	4,1	8,6
0,250% H ₂ O ₂	11,7	5,1	8,9
0,50% H ₂ O ₂	18,5	7,0	22,6
1,0% H ₂ O ₂	27,8	28,8	45,1

Πηγή: (Aman, 1992)

Η διαδικασία παρασκευής του εβαπορέ, του συμπυκνωμένου και του αφυδατωμένου γάλακτος, που είναι αποτέλεσμα μερικής ή ολικής απομάκρυνσης του ύδατος, με ή χωρίς την εφαρμογή θερμικής επεξεργασίας, συμβάλλει στην συμπύκνωση των στερεών συστατικών του γάλακτος και διαφόρων άλλων προσμίξεων όπως είναι η AFM₁. Έτσι, η τοξίνη μπορεί να γίνει πιο επιρρεπής στο O₂, το φως ή σε άλλους αποσταθεροποιητικούς παράγοντες. Σε ορισμένες έρευνες έχουν αναφερθεί τεράστιες απώλειες AFM₁, ενώ σε άλλες η συγκέντρωσή της παρέμεινε ανεπηρέαστη. Στην αποκορύφωση και βουτυροποίηση του γάλακτος, ο διαχωρισμός της κρέμας μπορεί να επηρεάσει την κατανομή της AFM₁, καθώς το 80% περνάει στο τμήμα του αποβουτυρωμένου γάλακτος και το 30% παραμένει ενωμένο στα μη λιπαρά στερεά, ειδικά με την καζεΐνη (Grant & Carlson, 1971).

Η συμπεριφορά της AFM₁ σε διαδικασίες οι οποίες περιλαμβάνουν το διαχωρισμό του λίπους, μπορεί να εξηγηθεί από τον ημιπολικό της χαρακτήρα: είναι μία υδατοδιαλυτή ένωση η οποία ενώνεται με τα υδροφοβικά τμήματα της καζεΐνης, και εξαιτίας αυτού κυριαρχεί στο τελικό μη λιπαρό προϊόν (Kanliou-Grigoriadou *et al.*, 2005).

Στα τυριά, η παρουσία της AFM₁ οφείλεται σε τρεις κύριες αιτίες:

α) στον «έμμεσο τύπο μόλυνσης», δηλαδή την παρασκευή μολυσμένου με AFM₁ φρέσκου ή ανασυσταμένου γάλακτος από γαλακτοπαραγωγές αγελάδες οι οποίες κατανάλωσαν ζωοτροφές μολυσμένες με AFB₁,

β) στον «άμεσο τύπο μόλυνσης», δηλαδή τη σύνθεση μυκοτοξινών από μύκητες, όπως τα είδη του γένους *Penicillium* και *Aspergillus*, τα οποία επιμολύνουν το τυρί και αναπτύσσονται σε αυτό και

γ) στην παραγωγή μυκοτοξινών από μύκητες που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή και ωρίμαση των τυριών (Fox *et al.*, 2004).

Μελέτες έχουν δείξει ότι η συγκέντρωση της AFM₁ κατά το διαχωρισμό του γάλακτος σε τυρόπηγμα και ορό γάλακτος παραμένει αμετάβλητη και περίπου το 40-57% της συνολικής AFM₁ μεταφέρεται στο τυρόπηγμα. Λαμβάνοντας υπόψη τον συντελεστή διαχωρισμού της AFM₁ στο νερό, θα ήταν αναμενόμενο το μεγαλύτερο ποσοστό της αφλατοξίνης να περνάει στον ορό του γάλακτος. Ωστόσο, ένα πολύ μεγαλύτερο από το αναμενόμενο ποσοστό της AFM₁ μεταφέρεται στο τυρόπηγμα, ενδεχομένως εξαιτίας της σύνδεσης της AFM₁ με τις καζεΐνες του γάλακτος. Επομένως, η παρουσία της AFM₁ στο τυρί είναι αποτέλεσμα δύο παραγόντων, αφενός της ικανότητας σύνδεσης της AFM₁ με τις καζεΐνες του γάλακτος και αφετέρου εξαιτίας της παραμονής ενός μέρους του ορού στο τυρόπηγμα (Fox *et al.*, 2004). Μελέτες έχουν δείξει ότι η συγκέντρωση της AFM₁ είναι περίπου 3 φορές μεγαλύτερη στα μαλακά τυριά και 5 φορές στα σκληρά σε σύγκριση με το γάλα από το οποίο προέρχονται. Επίσης, ορισμένες μελέτες έδειξαν ότι η ωρίμαση των τυριών και η πρωτεόλυση της καζεΐνης αυξάνει την ανάκτηση της AFM₁ καθώς η πρωτεόλυση επιδρά στις υδρόφοβες ομάδες της καζεΐνης απελευθερώνοντας την AFM₁ (Prandini *et al.*, 2009).

1.4. ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ M_1

1.4.1. Βιομετατροπή AFB_1 σε AFM_1

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η αφλατοξίνη M_1 (AFM_1) αποτελεί την υδροξυλιωμένη μορφή της αφλατοξίνης B_1 και μπορεί να παρατηρηθεί στο γάλα και τα προϊόντα γάλακτος που λαμβάνονται από ζώα που έχουν καταναλώσει ζωοτροφές μολυσμένες με αφλατοξίνη B_1 (Rahimi, 2010).

Η AFM_1 ανιχνεύεται στο γάλα 12-24h μετά από την πρώτη λήψη της AFB_1 από το ζώο και τα υψηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης παρατηρούνται εντός τριών ημερών (Applebaum *et al.*, 1982 & Jensen, 1995). Όταν διακοπεί η χορήγηση της μολυσμένης τροφής με AFB_1 στο ζώο, τα επίπεδα της AFM_1 στο γάλα μειώνονται αλλά εξακολουθεί να υπάρχει στο γάλα για διάστημα 6 ημερών (Applebaum *et al.*, 1982).

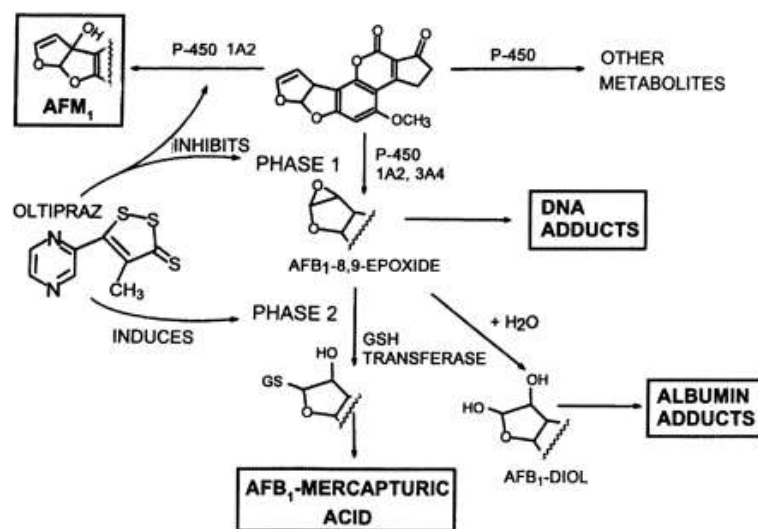
Ο σχηματισμός της AFM_1 γίνεται στο ήπαρ των ζώων και εν συνεχεία από εκεί εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος από όπου φτάνει στο μαστό και εκκρίνεται στο γάλα (Γεωργαλά & αλ., 2009).

Πιο αναλυτικά, οι λιπόφιλες μυκοτοξίνες με μικρό μοριακό βάρος, όπως η AFB_1 , απορροφώνται από τον πεπτικό σωλήνα των μηρυκαστικών μέσω του μηχανισμού της παθητικής διάχυσης και περνούν πρωταρχικά στην ηπατική πυλαία κυκλοφορία του αίματος (Polan *et al.*, 1974), ενώ ένα μικρό ποσοστό περνάει και στο λεμφικό σύστημα (Kumagai, 1989).

Έρευνες που έχουν διεξαχθεί σε πειραματόζωα και πρωτεύοντα στο εργαστήριο έδειξαν ότι η απορρόφηση της AFB_1 είναι πλήρης και ραγδαία. Σχετικές έρευνες έδειξαν ότι η απορρόφηση της συνδεδεμένης με τρίτιο [3H]- AFB_1 στον γαστρεντερικό σωλήνα των αγελάδων διεξάγεται με ταχείς ρυθμούς με αποτέλεσμα τη γρήγορη μεταφορά της AFM_1 στο γάλα (Polan *et al.*, 1974).

Μετά την στοματική πρόσληψη της AFB_1 , οι μεταβολίτες της εμφανίζονται ταχύτατα στα ούρα και το γάλα, ενώ το ποσοστό που εμφανίζεται στα κόπρανα είναι σχετικά μικρό, γεγονός που υποδηλώνει την έντονη απορρόφηση της AFB_1 στον πεπτικό σωλήνα των ζώων και τον ενεργό μεταβολισμό της στο ήπαρ. Έτσι, όταν η αφλατοξίνη

B₁ καταναλώνεται διαμέσου των μολυσμένων ζωοτροφών από τα ζώα, μετατρέπεται στο ήπαρ με τη βοήθεια των ενζύμων του μικροσωμιακού κυτοχρώματος P₄₅₀ σε AFM₁. Στη συνέχεια εκκρίνεται με αυτή τη μορφή στο γάλα, που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση και εξαιτίας της απορρόφησής της από τα μόρια της καζεΐνης, μπορεί επιπλέον να βρεθεί και σε διάφορα προϊόντα γάλακτος (Montagna *et al.*, 2008). Στην εικόνα 3 δίνεται μια σχηματική παράσταση των σταδίων του μεταβολισμού της AFB₁.



Εικόνα 3: Σταδία μεταβολισμού της AFB₁ και παράγοντες αδρανοποίησής της.

Πηγή: (Wang *et al.*, 1999).

Το πιο σημαντικό όργανο για τη βιομετατροπή της AFB₁ σε AFM₁ είναι το ήπαρ, αν και η μετατροπή αυτή μπορεί να παρατηρηθεί επίσης και στους νεφρούς και τον πεπτικό σωλήνα. Με εξαίρεση το AFB₁-8,9-εποξειδίο, τα προϊόντα της βιομετατροπής της AFB₁ είναι λιγότερο τοξικά από την ίδια. Τα ένζυμα του κυτοχρώματος P₄₅₀ (AFB₁ υδροξυλάση) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη βιομετατροπή της AFB₁ σε AFB₁-8,9-εποξειδίο, ο σχηματισμός του οποίου θεωρείται ο πιο σημαντικός καθώς το τελευταίο συνδέεται με το DNA, το RNA και τις πρωτεΐνες. Ένας σημαντικός τρόπος αποτοξίνωσης θεωρείται η σύζευξη του AFB₁-8,9-εποξειδίου με την γλουταθειονίνη. Άλλα προϊόντα της βιομετατροπής της AFB₁ είναι η AFQ₁ η οποία μεταβολίζεται στη συνέχεια σε AFH₁. Η AFB₁ μεταβολίζεται επίσης σε AFP₁, AFM₁, αφλατοξικόλη και άλλους μεταβολίτες (Gupta, 2007).

Η σχέση μεταξύ της ποσότητας της AFB₁ που λαμβάνει ένα ζώο όταν καταναλώνει μολυσμένες ζωοτροφές και της ποσότητας της AFM₁ που σχηματίζεται στο σκώτι του ζώου έχει βρεθεί ότι είναι γραμμική (Dragacci *et al.*, 1995).

Το 1998 ο Pettersson θέσπισε μία εξίσωση ανάμεσα στην ποσότητα της καταναλισκόμενης AFB₁ και της αντίστοιχης ποσότητας των μεταβολιτών της στο γάλα, βασιζόμενος σε 5 δοκιμές που πραγματοποίησε υπό ελεγχόμενες συνθήκες:

$$AFM_1 \text{ (ng/kg γάλακτος)} = 10.95 + 0.787X$$

Όπου X= μg ημερήσιας κατανάλωσης AFB₁, $r^2 = 0.915$ (Fink-Gremmels, 2008).

Ωστόσο, υπάρχουν πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν το ποσοστό της AFB₁ που μεταφέρεται στο γάλα ως AFM₁:

- οι ατομικές διαφορές μεταξύ των ζώων.
- στην αρχή της γαλακτοπαραγωγής, η μεταφορά είναι 3,3 με 3,5 φορές μεγαλύτερη από τη φάση της έντονης γαλακτοπαραγωγικής δραστηριότητας.
- η παρουσία μαστίτιδων
- η ποσότητα της καταναλισκόμενης AFB₁ (αγελάδες που καταναλώνουν ποσότητα AFB₁ < 40μg/κεφαλή/ημέρα παράγουν γάλα με περιεκτικότητα σε AFM₁ < 0,05 μg/kg). Σε περίπτωση κατανάλωσης μολυσμένων ζωοτροφών από τα ζώα, η AFM₁ θα εμφανιστεί στο γάλα 2-3 ημέρες μετά την κατανάλωση. Τα επίπεδα της AFM₁ στο γάλα μειώνονται και αγγίζουν το μηδέν 2-3 ημέρες μετά τη διατροφή των ζώων με σιτηρέσια απαλλαγμένα από αφλατοξίνες (Prandini *et al.*, 2009 & Veldman *et al.*, 1992).
- οι γεωγραφικοί και εποχιακοί παράγοντες. Η μόλυνση του γάλακτος και των προϊόντων του με AFM₁ παρουσιάζει έντονη εποχιακή διακύμανση. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι στο τέλος της θερινής περιόδου τα ζώα καταναλώνουν σε μεγαλύτερο βαθμό νομευτικά χόρτα σε σχέση με τις συμπυκνωμένες ζωοτροφές προκαλώντας έτσι μία μείωση στα επίπεδα της AFM₁ στο γάλα, ενώ το χειμώνα που η κατανάλωση πράσινου χόρτου και νομής είναι σαφέστατα μικρότερη το φαινόμενο αυτό αντιστρέφεται (Çelik *et al.*, 2005). Στον πίνακα 7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της εξέτασης γάλακτος και προϊόντων του στο Ιράν ως προς την εποχιακή διακύμανση της περιεκτικότητάς τους σε AFM₁. Για

το γάλα οι συγκεντρώσεις εκφράζονται σε $\mu\text{g/l}$ ενώ για τη γιαούρτη και το τυρί σε $\mu\text{g/kg}$. Όπως παρατηρούμε, στο γάλα οι συγκεντρώσεις εμφανίζονται πολύ μεγαλύτερες την περίοδο του χειμώνα ($p < 0,05$) καθώς τα ζώα τότε διατρέφονται κυρίως με συμπυκνωμένες ζωοτροφές που περιέχουν υψηλότερα επίπεδα AFB_1 . Στη βιομηχανική γιαούρτη, όπου χρησιμοποιείται βόειο γάλα, τα επίπεδα AFM_1 είναι σαφώς μεγαλύτερα σε σχέση με την παραδοσιακή, της οποίας η παραγωγή στηρίζεται κατεξοχήν στη χρήση μίγματος αίγειου και πρόβειου γάλακτος, τα οποία έχουν μικρότερες συγκεντρώσεις AFM_1 συγκριτικά με το βόειο. Τέλος, το τυρί Lighvan παρουσιάζει υψηλότερη συγκέντρωση AFM_1 την περίοδο της άνοιξης ($p < 0,05$) διότι την άνοιξη παραλαμβάνεται το τυρί που παρασκευάστηκε με χρήση γάλακτος που ελήφθη κατά την περίοδο του χειμώνα (χρόνος ωρίμασης: 3 μήνες) (Fallah *et al.*, 2011).

Πίνακας 7: Εποχιακή διακύμανση των συγκεντρώσεων της AFM_1 σε παραδοσιακά προϊόντα του Ιράν.

Προϊόν γάλακτος	Χειμώνας		Άνοιξη		Καλοκαίρι		Φθινόπωρο	
	Αριθμός δειγμάτων	Μέση τιμή \pm SEM	Αριθμός δειγμάτων	Μέση τιμή \pm SEM	Αριθμός δειγμάτων	Μέση τιμή \pm SEM	Αριθμός δειγμάτων	Μέση τιμή \pm SEM
Φρέσκο βόειο γάλα	24	$0,093 \pm 0,019$	21	$0,031 \pm 0,005$	21	$0,028 \pm 0,005$	22	$0,051 \pm 0,006$
Φρέσκο αίγειο γάλα	18	$0,035 \pm 0,005$	17	$0,013 \pm 0,004$	16	$0,011 \pm 0,004$	14	$0,012 \pm 0,005$
Φρέσκο πρόβειο γάλα	22	$0,046 \pm 0,008$	19	$0,021 \pm 0,007$	15	$0,019 \pm 0,005$	16	$0,019 \pm 0,006$
Βιομηχανική γιαούρτη	16	$0,038 \pm 0,010$	15	$0,013 \pm 0,006$	16	$0,012 \pm 0,005$	14	$0,041 \pm 0,009$
Παραδοσιακή γιαούρτη	15	$0,018 \pm 0,004$	15	$0,002 \pm 0,001$	15	$0,002 \pm 0,002$	15	$0,005 \pm 0,003$
Ιρανικό παραδοσιακό τυρί Lighvan	20	$0,083 \pm 0,020$	17	$0,162 \pm 0,024$	20	$0,051 \pm 0,015$	18	$0,053 \pm 0,018$

Πηγή: (Fallah *et al.*, 2011)

Στον πίνακα που ακολουθεί (πίνακας 8) δίνονται τα ποσοστά μόλυνσης του γάλακτος με AFM₁ όπως προέκυψαν από συγκριτικές μελέτες σε διάφορες χώρες του κόσμου.

Πίνακας 8: Ποσοστά μόλυνσης γάλακτος με AFM₁ όπως προέκυψαν από συγκριτικές μελέτες σε διάφορες χώρες του κόσμου.

Χώρα	Αριθμός δειγμάτων	Αριθμός μολυσμένων δειγμάτων	Ποσοστό
Ιράν (Babol)	78	78	100
Ιράν (Tabriz)	50	31	62
Ιράν (Sarab)	111	44	40
Ιράν (Shiraz)	624	101	17,8
Ιράν (Mashhad)	110	6	5,4
Ιράν (Τεχεράνη)	73	60	82,2
Ιαπωνία	208	207	99,5
Τουρκία	90	35	44,3
Βραζιλία	139	29	20,9
Πακιστάν	168	1	0,6
Λιβύη	49	35	71,4
Κορέα	180	143	76,6
Γερμανία	379	2	0,5
Αργεντινή	77	0	0
Ιταλία	161	0	0

Πηγή: (Movassagh, 2011).

Το ποσοστό μετατροπής της AFB₁ σε AFM₁ εξαρτάται από διατροφικούς, φυσιολογικούς και άλλους παράγοντες όπως το είδος της διατροφής, το ρυθμό κατανάλωσης, το ρυθμό πέψης, το είδος του ζώου, τη φυλή, την υγεία και την ατομικότητα του ζώου, την περίοδο γαλακτοπαραγωγής και τη συνολική παραγωγή γάλακτος. Αυτό σημαίνει πως το ποσοστό αυτό διαφέρει ακόμα και από ζώο σε ζώο μέσα στο ίδιο το κοπάδι, από ημέρα σε ημέρα και από άμελξη σε άμελξη (Martins & Martins, 2000).

Πρόσφατες έρευνες αποκαλύπτουν ότι ποσοστό 0,3-6,2% της AFB₁ που προσλαμβάνουν τα μηρυκαστικά ζώα όπως η αγελάδα, το πρόβατο και η αίγα μετατρέπεται σε AFM₁ και εκκρίνεται στο γάλα (Creppy, 2002).

Έρευνες επίσης έχουν δείξει ότι το ποσοστό της AFB₁ που μετατρέπεται σε AFM₁ είναι 0,40% για αίγες που διατρέφονται με 124,4μg AFB₁ καθημερινά για περίοδο 2 εβδομάδων (Rao & Chopra, 2001). Στα μηρυκαστικά, η επιπλέον παρουσία παραγόντων σύζευξης με την AFB₁, οδηγεί σε μείωση της απορρόφησής της από τον γαστρεντερικό σωλήνα και επομένως σε μείωση της συγκέντρωσης της AFM₁ στο γάλα (Diaz *et al.*, 2004 & Cannas & Pulina, 2008).

1.4.2. Τοξικότητα

1.4.2.1. Μελέτες σε ζώα

Οι επιδράσεις των αφλατοξινών στην υγεία των ζώων εξαρτώνται από το είδος του ζώου, την ηλικία, το φύλο, τη θρεπτική κατάσταση, τη δοσολογία, τη συχνότητα χορήγησης και τη σύσταση του γεύματος (Hui *et al.*, 2001).

Ένας από τους κυριότερους μεταβολίτες της AFB₁, ένα υψηλά ενεργό ηλεκτροφιλικό εποξειδίο, σχηματίζει ομοιοπολικά σύμπλοκα με το DNA, το RNA και τις πρωτεΐνες. Πιο αναλυτικά, η αφλατοξίνη συνδέεται με τη γουανίνη του DNA, διακόπτοντας το σήμα για τον σχηματισμό του αγγελιαφόρου RNA (mRNA) που σχετίζεται άμεσα με τη μεταγραφή. Η διακοπή της πρωτεϊνοσύνθεσης προκαλεί διαταραχές στις δομικές πρωτεΐνες και τα ένζυμα, τα οποία είναι απαραίτητα για τον ενεργειακό μεταβολισμό και το μεταβολισμό του λίπους. Έτσι, η έλλειψη σχηματισμού των πρωτεϊνών-υποδοχέων για τη σύνδεση του λίπους οδηγεί σε ηπατική στεάτωση και η μείωση των ενζύμων συμβάλλει σε μειωμένο σχηματισμό δομικών πρωτεϊνών, ακατάλληλο σχηματισμό αντισωμάτων, μειωμένη πέψη του λίπους, νέκρωση και μη ολοκληρωμένη σύνθεση θρομβοποιητικών παραγόντων (Osweiler, 1996).

Τα βοοειδή, τα πρόβατα και τα άλλα μηρυκαστικά παρατηρήθηκε ότι είναι λιγότερο ευπαθή από ότι τα μονογαστρικά ζώα και τα πτηνά, ενώ τα νεαρά ζώα όλων των ειδών είναι πιο ευπαθή σε σχέση με τα ενήλικα. Ακόμη, οι διατροφικές ελλείψεις σε πρωτεΐνη, σελήνιο και βιταμίνη Ε αυξάνουν την ευπάθεια σε αφλατοξίνες (Osweiler, 1996) ενώ διάφορες άλλες ουσίες, όπως η γκοσυπόλη, η 3-μεθυλοκουμαρίνη, τα λιπαρά οξέα του κυκλοπροπρενοϊκού, το μαλβαλικό και στερκολικό οξύ και πιθανόν η δεοξυνιβαλενόλη και η νιβαλενόλη, εμφανίζουν συνεργιστική δράση με την αφλατοξίνη ως προς την καρκινογένεση (Weidenbörner, 2001). Πιο συγκεκριμένα, στα ζώα η πρόσληψη τροφής με χαμηλά επίπεδα αφλατοξινών (περίπου 1ppm) μπορεί να προκαλέσει μείωση της ανάπτυξης, ανοσοκαταστολή, καταστροφή του ήπατος και αιμορραγία. Τα υψηλά επίπεδα, αντίστοιχα, συμβάλλουν σε οξεία απώλεια της όρεξης, κατάπτωση, αιμορραγία, μείωση της παραγωγής του γάλακτος, διάρροια, ίκτερο και θάνατο (Osweiler, 2005).

1.4.2.2. Μελέτες στην υγεία των ανθρώπων

Στον άνθρωπο, όπως και στα ζώα, οι επιπτώσεις από την κατανάλωση των αφλατοξινών στα τρόφιμα εξαρτώνται άμεσα από τη δοσολογία και το χρονικό διάστημα της έκθεσης στις αφλατοξίνες. Η οξεία αφλατοξίκωση χαρακτηρίζεται από έντονη ηπατοτοξικότητα με εκτεταμένη καταστροφή του ηπατικού παρεγχύματος, ανορεξία, κατάπτωση, χαμηλό πυρετό, έμετο, κοιλιακό άλγος και εμφανίζει ποσοστό θανάτων που αγγίζει το 25%. Η χρόνια έκθεση συμβάλλει στην εκδήλωση μεταλλάξεων και τερατογενέσεων, την ανοσοκαταστολή, την κακή θρεπτική κατάσταση, τον μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης του οργανισμού καθώς και στην πρόκληση του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος του οποίου η εκδήλωση φαίνεται να συσχετίζεται όπως προαναφέρθηκε με την ταυτόχρονη παρουσία της ηπατίτιδας Β και άλλων παραγόντων κινδύνου (WHO & U.S. C.D.C., 2005).

Όπως παρατηρείται, το ήπαρ θεωρείται το πρωταρχικό όργανο-στόχος σε πολλά είδη. Ωστόσο, έχουν παρατηρηθεί όγκοι και σε άλλα όργανα. Το αποτέλεσμα αυτό προκύπτει από το μεταβολισμό και την αποδόμηση των αφλατοξινών που περιγράφηκε ανωτέρω. Τα παράγωγα της AFB₁, όπως το AFB₁ 2-3 εποξειδίο, επιδρούν στο DNA με αλλαγή της βάσης G με την Τα με συνέπεια την πρόκληση διαφόρων μεταλλάξεων στην κωδικοποίηση περιοχών γονιδίων, κυρίως των ογκογόνων. Επιπλέον, μέσω της σύνδεσής της με το DNA, η AFB₁ συντελεί στον σχηματισμό κενών στις έλικές του καθώς αποτρέπει τη δράση της DNA πολυμεράσης στις περιοχές σύνδεσής της, γεγονός που και αυτό οδηγεί σε μεταλλάξεις. Επίσης, η AFB₁ έχει ενοχοποιηθεί για τερατογόνο επίδραση σε διάφορα ζώα, καθώς παρεμποδίζει τη σύνθεση των πρωτεϊνών των ευκαρυωτικών κυττάρων, γεγονός που συμβάλει στη διαταραχή της διαφοροποίησης των ευαίσθητων αρχέγονων κυττάρων (Labbé & García, 2001).

1.4.3. Επιδημιολογικά δεδομένα

Οι αφλατοξίνες εμφανίζουν δύο ειδών τοξικότητες: την οξεία και τη χρόνια. Η οξεία τοξικότητα σε ανθρώπους μετά από κατανάλωση αφλατοξινών στα τρόφιμα παρατηρείται σχετικά σπάνια. Το έτος 1967, 26 άτομα από την Ταϊβάν αρρώστησαν από προφανή τροφοδηλητηρίαση. Τα 19 εξ' αυτών ήταν παιδιά, από τα οποία τα 3 κατέληξαν. Παρόλο που δεν διεξήχθησαν μεταθανάτιες έρευνες, το ρύζι που καταναλώθηκε στα προσβεβλημένα νοικοκυριά περιείχε περίπου 200mg/kg αφλατοξίνη B₁, η οποία και θεωρήθηκε ο υπεύθυνος νοσογόνος παράγοντας. Το 1974 εκδηλώθηκε μία έξαρση ηπατίτιδας σε 400 Ινδούς, από τους οποίους 100 απεβίωσαν, ενώ το αίτιο που απομονώθηκε στο καλαμπόκι ήταν περίπου 15mg/kg αφλατοξινών λόγω μόλυνσής του με *Aspergillus flavus*. Η κατανάλωση των τοξινών από μερικούς ενήλικες υπολογίστηκε στα 2-6 mg σε μία μόνο ημέρα. Επομένως, μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι η οξεία θανατηφόρα δόση για τους ενήλικες είναι της τάξης των 10mg (Roberts *et al.*, 1996).

Στη συνέχεια, έρευνες έδειξαν ότι η νόσος Kwashiorkor, που εμφανίζεται κυρίως σε παιδιά της Β. Αφρικής, συνήθως αποδίδεται σε διατροφικές ελλείψεις αλλά μπορεί επιπλέον να συσχετιστεί και με την πρόσληψη αφλατοξίνης (Hendrickse *et al.*, 1982). Η προκαλούμενη καταστροφή του ήπατος από τις αφλατοξίνες καθιστά τα παιδιά με νόσο Kwashiorkor λιγότερα ικανά στην αφομοίωση πρωτεϊνούχων γευμάτων, τα οποία συνήθως συνιστώνται ως θεραπεία για τη νόσο (Newell, 1983).

Ενώ τα επιδημιολογικά δεδομένα αρχικά συνέδεσαν την εμφάνιση του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος με την κατανάλωση αφλατοξινών, μελέτες σε Αφρική και Ταϊλάνδη έδειξαν μία συσχέτιση ανάμεσα στη λογαριθμική πρόσληψη των αφλατοξινών και την εμφάνιση του καρκίνου του ήπατος (van Rensburg, 1977).

Ωστόσο, άλλες έρευνες στις Η.Π.Α. έφεραν στο φως αντίθετα αποτελέσματα. Σε αντιπαράθεση με τις πρώτες, νέες έρευνες έδειξαν ότι ενώ τα παιδιά των αγροτικών περιοχών στις Η.Π.Α. κατανάλωναν καλαμπόκι με ποσότητες αφλατοξινών ικανές να προκαλέσουν 4-10 θανάτους λόγω καρκίνου του ήπατος σε πληθυσμό 100.000 ατόμων, ο πραγματικός ρυθμός θανάτων ήταν μικρότερος από 1/100.000 (Stoloff & Friedman, 1976). Η απάντηση στις διαφορές που προέκυψαν μεταξύ των ερευνών αυτών

βασιζόταν στο γεγονός ότι η προηγούμενη ή η ταυτόχρονη έκθεση στον ιό της ηπατίτιδας Β μπορεί να αποτελέσει προαπαιτούμενο για την πρόκληση αυτού του τύπου του καρκίνου του ήπατος στον άνθρωπο. Οι αφλατοξίνες και η ηπατίτιδα Β είναι προφανώς συγκαρκινογόνοι παράγοντες, και η πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του ήπατος στους ανθρώπους είναι υψηλή μόνο σε περιοχές όπου επικρατούν και οι αφλατοξίνες και ο HBV (Roberts *et al.*, 1996).

1.5. ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ

Η αφλατοξίνη B₁ (AFB₁) αποτελεί την πιο επικίνδυνη καρκινογόνο ουσία που απαντάται στη φύση και κατατάσσεται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) στην Ομάδα 1 του IARC (καρκινογόνοι παράγοντες για τον άνθρωπο) (Rosi *et al.*, 2007). Σύμφωνα με την οδηγία 99/29 ΕΕ, με την οποία έχουν νομοθετηθεί τα μέγιστα επιτρεπτά όρια για την αφλατοξίνη B₁ στις ζωοτροφές, ως ανώτερο νομοθετικό όριο για όλες τις αμιγείς ζωοτροφές προβλέπονται τα 50ppb, εκτός από τα ειδικά σιτηρέσια, όπως το πλήρες σιτηρέσιο γαλακτοπαραγωγών αγελάδων για το οποίο το μέγιστο όριο είναι τα 5ppb, το πλήρες σιτηρέσιο μόσχων και αμνών με 10ppb, το πλήρες σιτηρέσιο χοιρινών και πτηνών με 20ppb κ.ά (Βάσσος, 2004).

Στις Η.Π.Α., όπου οι ζωοτροφές χρησιμοποιούνται ταχέως προτού λάβει χώρα η εκτεταμένη ανάπτυξη των μυκήτων και μετά από μίξη των ζωοτροφών, ο κίνδυνος τοξίνωσης με αφλατοξίνες είναι μηδαμινός, με αποτέλεσμα ο FDA να έχει θεσπίσει τα εξής όρια για τις αφλατοξίνες: 20 ppb (20μg/kg) στις ζωοτροφές και 0,5 ppb (0,5 μg/kg) στο γάλα (Jensen, 1995).

Σε ό,τι αφορά την AFM₁, σύμφωνα με δεδομένα μελετών που προέρχονται από αναλύσεις μεγάλου αριθμού δειγμάτων γάλακτος, η μέση ημερήσια πρόσληψη της αφλατοξίνης M₁ από το γάλα υπολογίζεται στα 6,8 ng για τους Ευρωπαίους, στα 3,5 ng για τους Λατινοαμερικάνους, στα 12 ng και 0,7 ng για τους κατοίκους της Άπω και Κεντρικής Ανατολής αντίστοιχα και στα 0,1 ng για τους Αφρικάνους (Creppy, 2002).

Στην Ελλάδα, σχετική έρευνα που έλαβε χώρα έφερε στο φως τα ακόλουθα συμπεράσματα: Σε 28 δείγματα νωπού αγελαδινού γάλακτος που εξετάστηκαν, η τιμή της συγκέντρωσης της AFM₁ βρέθηκε χαμηλότερη σε σχέση με τα 54 δείγματα του παστεριωμένου, ενώ ένα δείγμα αγελαδινού γάλακτος από τα 28 περιείχε AFM₁ σε συγκέντρωση που υπερέβαινε το ανώτατο επιτρεπόμενο νομοθετικό όριο (55ng/l). Η μόλυνση του νωπού πρόβειου και αίγειου γάλακτος ήταν σαφώς μικρότερη (66,7% και 40% αντίστοιχα), και κανένα από τα θετικά δείγματα (11 θετικά/15 δείγματα πρόβειου και 8 θετικά/12 δείγματα αίγειου γάλακτος) δεν υπερέβαινε τα 50ng/l. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι κατά τη διάρκεια του χειμώνα και της άνοιξης, τα

αιγοπρόβατα που παράγουν γάλα στην Ελλάδα τρέφονται με λιγότερες ζωοτροφές σε σχέση με τις αγελάδες διότι σημαντικό μέρος της διατροφής τους στηρίζεται στη βόσκηση. Το ποσοστό της AFM₁ στο θερμικά επεξεργασμένο με τη μέθοδο UHT γάλα ήταν ελαφρώς μικρότερο σε σχέση με αυτό του παστεριωμένου (82,3 έναντι 85,4%), αν και ο αριθμός των δειγμάτων δε θεωρούνταν ικανοποιητικός. Ωστόσο, το ομογενοποιημένο και θερμικά επεξεργασμένο γάλα με τη μέθοδο UHT υπερέβαινε στα επίπεδα της μόλυνσης το παστεριωμένο καθώς η πλειονότητα των δειγμάτων του θερμικά επεξεργασμένου με τη μέθοδο UHT γάλακτος (35,3%) περιλάμβανε AFM₁ στα 11-20ng/l, ενώ 23,5% των θερμικά επεξεργασμένων με τη μέθοδο UHT δειγμάτων βρισκόταν στα 21-50ng/l. Σχετικά με το συμπυκνωμένο γάλα, από τα 15 δείγματα τα 14 ήταν θετικά. Τα 6 από αυτά κυμαίνονταν σε συγκεντρώσεις 21-50ng/l, ενώ 2 υπερέβαιναν το νομοθετικό όριο εμφανίζοντας συγκεντρώσεις AFM₁ 64 και 70ng/l αντίστοιχα. Στον πίνακα 9 συνοψίζονται τα συμπεράσματα των αναλύσεων αυτών (Roussi *et al.*, 2002).

Πίνακας 9: Παρουσία της AFM₁ σε παστεριωμένο, νωπό, UHT και συμπυκνωμένο γάλα που συγκεντρώθηκε στην Ελλάδα (12/1999-5/2000).

Τύπος γάλακτος	Αριθμός δειγμάτων	Θετικά δείγματα (>5ng/l)	Συχνότητα κατανομής των δειγμάτων (ng/l)				
			<5	5-10	11-20	21-50	>50
Παστεριωμένο	82	70(85,4%)	12(14,6%)	42(51,2%)	18(21,9%)	10(12,2%)	0(0%)
Νωπό αγελαδινό	30	22(73,3%)	8(26,7%)	7(23,3%)	10(13,3%)	4(13,3%)	1(3,3%)
Νωπό πρόβειο	12	8(66,7%)	4(33,3%)	3(25,0%)	3(25,0%)	2(16,7%)	0(0%)
Νωπό αίγαιο	10	4(40,0%)	6(60,0%)	0(0%)	2(20,0%)	2(20,0%)	0(0%)
UHT	17	14(82,3%)	3(17,6%)	4(23,5%)	6(35,3%)	4(23,5%)	0(0%)
Συμπυκνωμένο	15	14(93,3%)	1(6,7%)	2(13,3%)	4(26,7%)	6(40,0%)	2(13,3%)

Πηγή: (Roussi *et al.*, 2002)

Επίσης, σε έρευνα μεταξύ παστεριωμένου και νωπού γάλακτος που έλαβε χώρα στην Ελλάδα από το Νοέμβριο του 1986 έως το Μάρτιο του 1987, σε 4 από 99 συνολικά δείγματα νωπού γάλακτος, η τιμή της συγκέντρωσης της AFM₁ κυμαινόταν από 100 έως 130ng/l. Κάτι αντίστοιχο δεν παρατηρήθηκε στο παστεριωμένο. Σε πιο πρόσφατη

έρευνα στην Ελλάδα (1995-1996) η AFM₁ στο παστεριωμένο γάλα προσδιορίστηκε σε χαμηλότερα επίπεδα, αλλά το ποσοστό μόλυνσης ήταν υψηλότερο καθώς 3 από τα 81 δείγματα περιείχαν AFM₁ σε συγκεντρώσεις 170, 177 και 160ng/l (Roussi *et al.*, 2002).

Η AFM₁, η οποία αποτελεί τον υδροξυλιωμένο μεταβολίτη της AFB₁, αν και λιγότερο καρκινογόνος και μεταλλαξιογόνος από την AFB₁ θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική για τη Δημόσια Υγεία διότι εμφανίζει ανάλογη ηπατοτοξικότητα και κυτταροτοξικότητα και μπορεί να καταστείλει το ανοσοποιητικό σύστημα των βρεφών (Wang *et al.*, 2010).

Η έκθεση των παιδιών, συμπεριλαμβανομένων των βρεφών, στην αφλατοξίνη M₁ είναι ιδιαίτερα ανησυχητική καθώς θεωρούνται πιο επιρρεπή στις δυσμενείς επιπτώσεις της και η ικανότητά τους για βιομετατροπή των καρκινογόνων ουσιών είναι συγκριτικά μικρότερη σε σχέση με αυτή των ενηλίκων (Rahimi, 2010).

Γι'αυτόν τον λόγο, ενώ αρχικά ο IARC είχε ταξινομήσει την AFM₁ στην Ομάδα 2B, δηλαδή στους πιθανούς καρκινογόνους παράγοντες για τον άνθρωπο, στη συνέχεια, σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, την τοποθέτησε στην Ομάδα 1 (Wang *et al.*, 2010 & IARC, 1993 & IARC, 2002).

Στην Taiwan και στις Η.Π.Α., τα ανώτερα επιτρεπόμενα επίπεδα AFM₁ κυμαίνονται κάτω από τα 0,5μg/l (Chen *et al.*, 2005).

Στην Ευρώπη, οι μέγιστες τιμές ανοχής της AFM₁ στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως αρχικά ορίστηκαν από τον Κανονισμό CE 2174/2003, που τροποποίησε τον Κανονισμό CE 466/2001, και όπως ορίστηκαν στη συνέχεια από τον Κανονισμό (ΕΕ) 165/2010, ο οποίος τροποποίησε τον Κανονισμό (ΕΚ) 1881/2006, δεν πρέπει να υπερβαίνουν στο νωπό γάλα, το γάλα που υφίσταται θερμική επεξεργασία και το γάλα που χρησιμοποιείται για την παρασκευή προϊόντων με βάση το γάλα τα 0,05 μg/kg (=0,05ppb=50ppt), ενώ στα παρασκευάσματα για βρέφη και τα παρασκευάσματα δεύτερης βρεφικής ηλικίας, συμπεριλαμβανομένου του γάλακτος για βρέφη και του γάλακτος δεύτερης βρεφικής ηλικίας καθώς και στα διαιτητικά τρόφιμα για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς που προορίζονται ειδικά για βρέφη ορίζεται σε 0,025 μg/kg (Montagna *et al.*, 2008 & Κανονισμός (ΕΕ) 165/2010).

Στον πίνακα 10 συνοψίζονται τα επιτρεπόμενα όρια της AFM₁ στο γάλα και τα προϊόντα του.

Πίνακας 10: Ανώτερα επιτρεπόμενα νομοθετικά όρια σχετικά με την συγκέντρωση της AFM₁ στο γάλα και τα προϊόντα του.

Χώρα	Φρέσκο γάλα (μg/kg)	Γαλακτοκομικά προϊόντα (μg/kg)
Ευρωπαϊκή Ένωση	0,05	0,05
Ελλάδα	0,05	
Αυστρία	0,05 0,01 (παστεριωμένο βρεφικό γάλα)	0,02 (βούτυρο) 0,25 (τυρί) 0,4 (σκόνη γάλακτος)
Γαλλία	0,05 (γάλα ενηλίκων) 0,03 (παιδιά <3 ετών)	
Ελβετία	0,05	0,025 (γάλα, ορό γάλακτος και προϊόντα) 0,25 (τυρί) 0,02 (βούτυρο)
Κάτω Χώρες		0,02 (βούτυρο) 0,20 (τυρί)
Βουλγαρία	0,50	0,10 (σκόνη γάλακτος)
Ρουμανία	0	0
Δημοκρατία της Τσεχίας	0,25 (βρεφικό γάλα) 0,50 (γάλα ενηλίκων)	
Η.Π.Α.	0,50	
Βραζιλία	0,50	5,0 (σκόνη γάλακτος)
Αργεντινή	0,05	0,50 (προϊόντα γάλακτος)
Ονδούρα	0,05	0,25 (τυρί)
Νιγηρία	1	
Αίγυπτος	0	0
Τουρκία	0,05	0,25 (τυρί)

Πηγές: (Colak et al., 2006 & Creppy, 2002 & Çelik et al., 2005).

1.6. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ

1.6.1. Εισαγωγή

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι αφλατοξίνες αποτελούν σημαντικό κίνδυνο για τη Δημόσια Υγεία και δεδομένου ότι το γάλα αποτελεί μία από τις σημαντικότερες τροφές και το κυριότερο θρεπτικό συστατικό για την ανάπτυξη των νεαρών ατόμων, θα πρέπει γι' αυτόν τον λόγο να υφίσταται συχνότερο έλεγχο για την παρουσία καταλοίπων AFM₁.

Πολλές μέθοδοι ανάλυσης έχουν κατά καιρούς αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό της AFM₁ στο γάλα και τα προϊόντα γάλακτος, είτε για έλεγχο διαλογής είτε για ποσοτικούς προσδιορισμούς (Tajik *et al.*, 2007).

Οι πιο συνηθισμένες μέθοδοι για την ανίχνευση της AFM₁ στο γάλα και στα προϊόντα γάλακτος είναι η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), η υγρή χρωματογραφία (LC), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) συνδυασμένη με ανιχνευτή φθορισμού ή φασματομετρία μαζών (MS) και η ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA. (Γεωργαλά & *αλ.*, 2009). Από αυτές, σε επίπεδο ρουτίνας χρησιμοποιούνται κυρίως η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και η ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA (Colak *et al.*, 2006).

1.6.2. Χρωματογραφικές μέθοδοι

Καθώς παρουσιάζουν έντονο φθορισμό στο υπεριώδες φως (UV light), οι αφλατοξίνες μπορούν να προσδιοριστούν ποσοτικά μέσω της μέτρησης της έντασης του φθορισμού τους. Συνηθέστερα, για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) και η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Τα πιο αξιόπιστα αποτελέσματα λαμβάνονται με την TLC δύο διαστάσεων σε συνδυασμό με HPTLC και δύο είδη κατάλληλων διαλυτών [συνηθέστερα χλωροφόρμιο-ακετόνη (9:1) και διεθλαιθέρας-μεθανόλη-νερό (94: 4,5: 1,5)]. Επειδή, οι αφλατοξίνες δίνουν έντονο φθορισμό στην TLC όταν εκτίθενται σε υπεριώδες φως, η ευαισθησία αυτής της μεθόδου για την ανίχνευση της αφλατοξίνης είναι τόσο υψηλή που μπορεί να ανιχνεύσει συγκεντρώσεις των 0,1-0,2ng ανά δείγμα. Η αδυναμία της μεθόδου έγκειται στο γεγονός ότι για την ποσοτική ανάλυση απαιτείται πυκνομέτρηση. Από την άλλη, η μέθοδος HPLC περιλαμβάνει δύο είδη, τη χρωματογραφία ανεστραμμένης φάσης (reverse phase chromatography) και τη χρωματογραφία κανονικής φάσης (normal phase chromatography). Στη χρωματογραφία κανονικής φάσης, χρησιμοποιείται στήλη διοξειδίου του πυριτίου (silica gel) και μία μη πολική κινητή φάση (τολουόλιο/ οξικός αιθυλεστέρας/ μεθανόλη/ φορμικό οξύ, 500/ 50/ 20/ 10). Το δείγμα εγχέεται άμεσα στο σύστημα χωρίς τον σχηματισμό παραγώγων. Το μειονέκτημα που παρουσιάζεται είναι ότι απαιτούνται υψηλές συγκεντρώσεις οργανικών διαλυτών. Από την άλλη πλευρά, στην χρωματογραφία ανεστραμμένης φάσης, συνήθως χρησιμοποιείται στήλη σιλανίων (octadecyl silane) και μία πολική κινητή φάση. Η μέθοδος έχει καλή ειδικότητα, παρόλο που παρατηρείται απώλεια μέρους των AFB₁, AFM₁ και AFG₁ καθώς αντιδρούν με το τριφλουροοξικό οξύ (TFA) προς σχηματισμό παραγώγων (Tabata, 2004).

Η TLC είναι η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στην ανίχνευση της AFM₁ (Wang, 2010). Οι Gilbert και Anklaam το 2002 ανακοίνωσαν ότι η μέθοδος TLC έχει μεγαλύτερο συντελεστή διακύμανσης και ότι έχει χρησιμοποιηθεί μόνο εκεί όπου τα επίπεδα μόλυνσης της αφλατοξίνης είναι υψηλότερα από τα ανώτερα επιτρεπόμενα όρια (Colak *et al.*, 2006). Την τελευταία δεκαετία, έχει σχεδόν εξολοκλήρου αντικατασταθεί από την HPLC και τις τεχνικές φθορισμομετρίας. Από την άλλη, η μέθοδος HPLC περιλαμβάνει πολλά στάδια κατά την προετοιμασία του δείγματος, με αποτέλεσμα να καταναλώνει

αρκετό χρόνο, πολλούς χημικούς διαλύτες ενώ παράλληλα απαιτεί και καλά εξειδικευμένο προσωπικό (Wang, 2010).

Γι' αυτόν τον λόγο, σε επίπεδο ρουτίνας και σε ερευνητικές μελέτες προτιμώνται να χρησιμοποιούνται περισσότερο οι ανοσολογικές μέθοδοι έναντι των χρωματογραφικών (Colak *et al.*, 2006). Από αυτές τις τεχνικές, η περισσότερο χρησιμοποιούμενη τα τελευταία χρόνια είναι η ELISA (Zheng *et al.*, 2006).

1.6.3. ELISA (*Enzyme linked immuno-sorbent assay*)

Η μέθοδος ELISA χρησιμοποιείται στην ανάλυση των μυκοτοξινών εδώ και πάνω από μια δεκαετία. Η τεχνολογία της μεθόδου αυτής στηρίζεται στην ικανότητα ενός ειδικού αντισώματος να διακρίνει την τρισδιάστατη δομή μιας συγκεκριμένης μυκοτοξίνης (Zheng *et al.*, 2006).

Η ELISA είναι μία μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται κυρίως σε επίπεδο ελέγχου διαλογής χάρη στα πολλαπλά πλεονεκτήματα που παρουσιάζει όπως η ταχύτητα, η ευκολία στην εφαρμογή και το χαμηλό κόστος (Cigic & Prosen, 2009). Ο συνδυασμός της υψηλής ειδικότητας της ένωσης των αντιγόνων με τα ειδικά για αυτά αντισώματα καθώς και η ευαισθησία της ανίχνευσης ενός ενζύμου καθιστούν τη μέθοδο ELISA ιδανική στον προσδιορισμό των αναλυτών σε σύνθετα μείγματα πολλαπλών συστατικών χωρίς να χρειάζεται να προηγηθεί της ανάλυσης κάποιος διαχωρισμός ή να διενεργηθεί απομάκρυνση άλλων προσμείξεων (Goryacheva *et al.*, 2008).

Η μέθοδος της ELISA προτιμάται ιδιαίτερα καθώς απαιτεί μικρούς όγκους δείγματος, λιγότερες διαδικασίες καθαρισμού και προετοιμασίας του δείγματος συγκριτικά με τις συμβατικές μεθόδους, όπως η TLC και η HPLC. Η μέθοδος είναι πλήρως ποσοτική. Είναι ταχεία, απλή και παρέχει ικανοποιητική ευαισθησία και ειδικότητα (Zheng *et al.*, 2006). Η ευαισθησία και η ειδικότητα της ELISA κυρίως βασίζονται στη φύση των χρησιμοποιούμενων αντισωμάτων, τα οποία είναι κυρίως μονοκλωνικά αντισώματα, δηλαδή καθαρά αντισώματα συγκεκριμένης ειδικότητας, αν και πρόσφατα χρησιμοποιούνται και ανασυνδυασμένα. Η ακρίβεια της μεθόδου εξαρτάται από τη φύση της μυκοτοξίνης, τη διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος, και τη φύση του υλικού, ενώ προηγούμενος διαχωρισμός επιτρέπει τη βελτίωση της ακρίβειας και αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου (Goryacheva *et al.*, 2008).

Αν και τα αντισώματα διαθέτουν το πλεονέκτημα της υψηλής εξειδίκευσης και ευαισθησίας, επειδή οι ενώσεις-στόχοι είναι μυκοτοξίνες, διάφορες άλλες ενώσεις με παρόμοια χημική δομή μπορούν επίσης να αντιδράσουν με τα αντισώματα. Αυτό το φαινόμενο, γνωστό και ως φαινόμενο πλάσματος (“matrix effect” ή “matrix interference”), είναι πολύ συχνό στην εκτέλεση της δοκιμής της ELISA, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο σε υπερτιμήσεις ή υποτιμήσεις των συγκεντρώσεων της

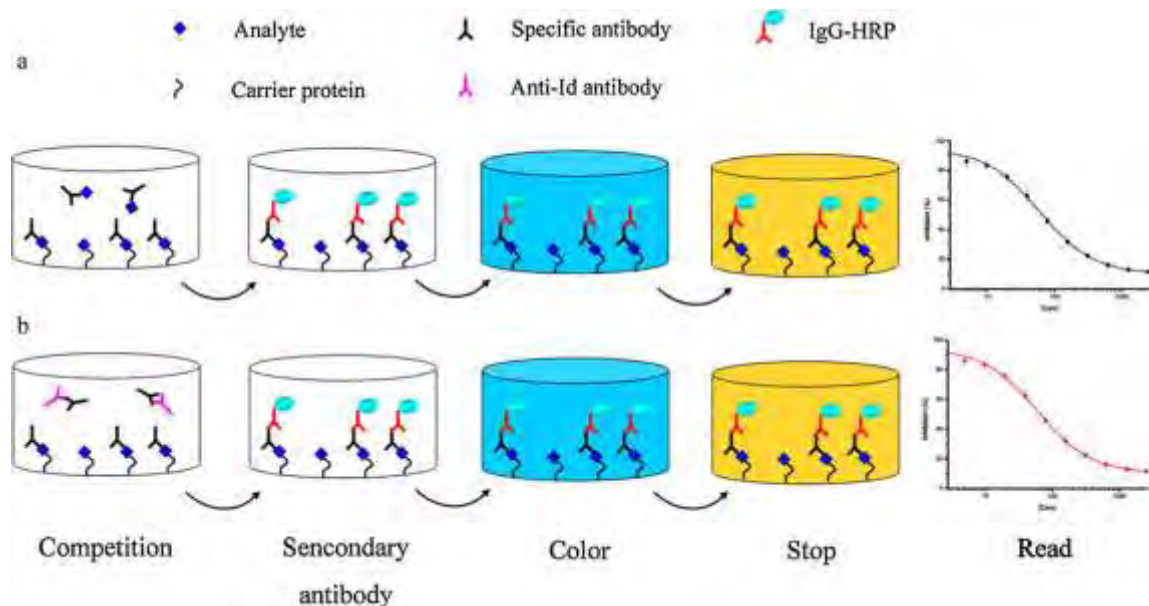
μυκοτοξίνης στο δείγμα. Επιπρόσθετα, η ανεπαρκής επικύρωση της μεθόδου ELISA συμβάλλει στον περιορισμό εφαρμογής της μόνο σε εκείνα τα μόρια για τα οποία έχει επικυρωθεί (Zheng *et al.*, 2006). Ειδικά, σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες των 0,05μg/l δεν είναι απόλυτα αξιόπιστη μέθοδος καθώς λαμβάνουν χώρα διάφορες διασταυρούμενες αντιδράσεις (Biancardi, 1997 & Chen *et al.*, 2005).

Γι'αυτό, κρίνεται σκόπιμη μία εκτεταμένη έρευνα πάνω στην ακρίβεια και την ορθότητα που προσφέρει η μέθοδος ενώ παράλληλα θεωρείται σημαντική και κρίσιμη μία πλήρης επικύρωση της μεθόδου (Zheng *et al.*, 2006).

Στην ανάλυση των αφλατοξινών χρησιμοποιείται ευρύτατα η ανταγωνιστική ELISA, η οποία διακρίνεται στην άμεση, την έμμεση και τη διπλή ELISA (sandwich ELISA).

Στην άμεση ELISA, η οποία θεωρείται η πιο απλουστευμένη μορφή της ELISA και η συχνότερα χρησιμοποιούμενη, Ag προσροφώνται παθητικά μέσω επώασης στη στερεά φάση. Τα μη συνδεδεμένα Ag απομακρύνονται με έκπλυση ενώ στη συνέχεια προστίθενται ειδικά για το συγκεκριμένο Ag ενζυμοσύνδετα Abs. Μετά την επώαση γίνεται έκπλυση και απομάκρυνση όλων των μη ειδικών ενζυμοσύνδετων Abs που δεν προσκολλήθηκαν στο συγκεκριμένο Ag και ακολουθεί προσθήκη χρωμογόνου υποστρώματος για την παραγωγή ορατού σήματος που δείχνει την ποσότητα του αντιγόνου. Τέλος, προστίθεται stop solution για διακοπή της ενζυμικής αντίδρασης και ποσοτικοποίηση του ορατού σήματος με τη χρήση φασματοφωτόμετρου (Crowther, 2001).

Στην έμμεση ELISA (εικόνα 4) τα στάδια 1, 2, 5 και 6 είναι κοινά με αυτά της άμεσης ELISA. Οι μόνες διαφορές μεταξύ τους παρατηρούνται στο τρίτο και τέταρτο στάδιο. Στο τρίτο στάδιο γίνεται προσθήκη μη σημασμένων αντισωμάτων, τα οποία διαλύονται στο διάλυμα και προλαμβάνουν τη μη ειδική προσκόλληση των πρωτεϊνών του αντιορού στη στερεά φάση (blocking buffer). Ακολουθεί επώαση και έκπλυση για απομάκρυνση των μη συνδεδεμένων αντισωμάτων. Στη συνέχεια, στο τέταρτο στάδιο, προστίθενται ειδικά ενζυμοσύνδετα αντι-αντισώματα (conjugate anti-species Abs) και ακολουθεί επώαση και έκπλυση για απομάκρυνση όσων παρέμειναν ασύνδετα (Crowther, 2001). Όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αναλύτη, τόσο μικρότερο είναι το ορατό σήμα (Guan *et al.*, 2011).

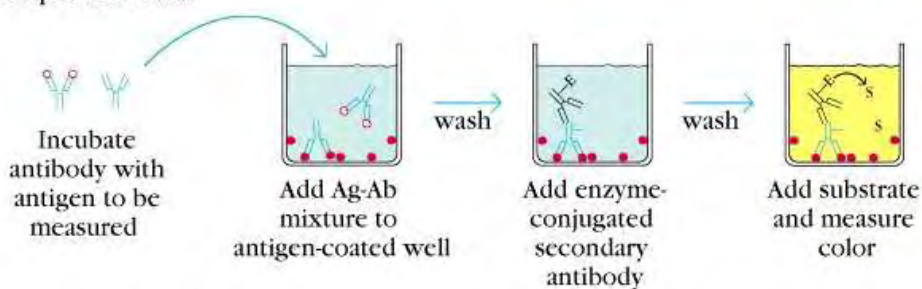


Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση σταδίων έμμεσης ανταγωνιστικής ELISA.

Πηγή: (Guan et al., 2011).

Στη διπλή - sandwich – ELISA (εικόνα 5) αντισώματα για ένα συγκεκριμένο αντιγόνο προσκολλώνται παθητικά στον πυθμένα μιας πλάκας μικροτιτλοδότησης. Όσα αντισώματα δεν προσκολλήθηκαν απομακρύνονται με έκπλυση. Προστίθενται τα Ag και όσα είναι ειδικά για το συγκεκριμένο αντίσωμα προσκολλώνται με επώαση σε αυτό. Ακολουθεί έκπλυση για απομάκρυνση των μη συνδεδεμένων με το αντίσωμα αντιγόνων. Έπειτα γίνεται προσθήκη ενζυμοσύνδετου μονοκλωνικού αντισώματος, ακολουθεί επώαση και έκπλυση για απομάκρυνση όσων μη ειδικών αντισωμάτων δεν συνδεθήκαν με το Ag. Τέλος, προστίθεται χρωμογόνο υπόστρωμα, επιτελείται ενζυμική αντίδραση και το ορατό σήμα που παράγεται μετά την προσθήκη του αντιδραστηρίου «stop solution» για διακοπή της αντίδρασης, μετρίεται φασματοφωτομετρικά. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντιγόνου (Crowther, 2001).

(c) Competitive ELISA



Εικόνα 5: Στάδια sandwich ELISA.

Στον πίνακα 11 παρουσιάζονται τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα που παρουσιάζουν οι μέθοδοι προσδιορισμού των αφλατοξινών που αναλύθηκαν παραπάνω.

Πίνακας 11: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα μεθόδων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης αφλατοξινών.

Μέθοδος	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
TLC	<ul style="list-style-type: none"> • Απλή, φθηνή, γρήγορη • Ανιχνεύει τα περισσότερα είδη μυκοτοξινών • Ευαισθησία στην ανίχνευση αφλατοξινών • Επιτρέπει την ταυτόχρονη εξέταση μεγάλου αριθμού δειγμάτων 	<ul style="list-style-type: none"> • Ο διαχωρισμός ενδέχεται να μην είναι ικανοποιητικός • Σε μερικές περιπτώσεις απαιτείται επιβεβαίωση • Παρουσιάζει χαμηλή ακρίβεια
HPTLC	<ul style="list-style-type: none"> • Επιτρέπει την ποσοτικοποίηση όταν συνδυάζεται με την πυκνομέτρηση • Επιτρέπει την ταυτόχρονη εξέταση μεγάλου αριθμού δειγμάτων • Καλύτερος διαχωρισμός σε συνδυασμό με TLC 	<ul style="list-style-type: none"> • Παρουσιάζει χαμηλή ευαισθησία για ορισμένες μυκοτοξίνες

ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Επιτρέπει την ποσοτικοποίηση και παρέχει βελτιωμένα όρια ανίχνευσης 	<ul style="list-style-type: none"> • Το υπόστρωμα ενδέχεται να επηρεάσει το αποτέλεσμα • Τα αντισώματα μπορεί να προκαλέσουν διασταυρούμενη αντίδραση
HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • Ευαίσθητη, εκλεκτική • Εύκολη στην αυτοματοποίηση 	<ul style="list-style-type: none"> • Τα συστατικά πρέπει να παρουσιάζουν απορρόφηση στο υπεριώδες ή φθορισμό
HPLC/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Παρέχει υψηλά επίπεδα επιβεβαίωσης • Πολύ ευαίσθητη 	<ul style="list-style-type: none"> • Δαπανηρή • Απαιτεί ειδικευμένο προσωπικό
GC/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Παρέχει υψηλά επίπεδα επιβεβαίωσης • Πολύ ευαίσθητη 	<ul style="list-style-type: none"> • Δαπανηρή • Απαιτεί ειδικευμένο προσωπικό • Μόνο για πτητικά συστατικά
Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση	<ul style="list-style-type: none"> • Χρήση μικρής ποσότητας διαλύτη • Γρήγορη • Εναλλακτική μέθοδος διαχωρισμού 	<ul style="list-style-type: none"> • Η χρήση της δεν είναι αρκετά διαδεδομένη

Πηγή: (Diaz, 2005).

2.1. ΕΠΙΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Το γάλα είναι ένα προϊόν ευρείας κατανάλωσης, το οποίο εδώ και χιλιάδες χρόνια χρησιμοποιείται στη διατροφή των ανθρώπων όλων των ηλικιακών ομάδων καθώς βοηθά στην ισορροπημένη διατροφή.

Όπως έχει συζητηθεί και καταγραφεί στα πρακτικά αρκετών πρόσφατων διεθνών συνεδρίων, η σημασία των αιγών στην παραγωγή του κρέατος και των προϊόντων γάλακτος είναι ιδιαίτερα μεγάλη, γεγονός που αντικατοπτρίζεται στη δραματική αύξηση του αριθμού των αιγών τα τελευταία 20 χρόνια καθώς και στην τεράστια αύξηση της παραγωγής αίγειου γάλακτος συγκριτικά με την παραγωγή των υπόλοιπων ειδών (Haenlein, 2004). Οι κύριοι λόγοι που οδήγησαν σε αυτό το φαινόμενο είναι οι εξής:

- ❖ Το αίγειο γάλα εμπεριέχει πολύ περισσότερα μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα καθώς και τριγλυκερίδια μέσης αλύσου σε σχέση με το βόειο γάλα. Τα λιπαρά αυτά οξέα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διατροφή του ανθρώπου και την ιατρική επιστήμη αφενός εξαιτίας της μοναδικής μεταβολικής τους ικανότητας, να παρέχουν άμεση ενέργεια στον οργανισμό αντί να εναποτίθενται στους λιπώδεις ιστούς και αφετέρου επειδή παρεμποδίζουν την εναπόθεση της χοληστερόλης μέσω της μείωσής της στον ορό (Haenlein, 2004). Στον πίνακα 12 παρουσιάζεται η περιεκτικότητα του αίγειου γάλακτος σε λιπαρά οξέα συγκριτικά με το βόειο.

Πίνακας 12: Περιεκτικότητα αίγειου και βόειου γάλακτος σε λιπαρά οξέα (g/100g γάλακτος).

	Αίγειο γάλα	Βόειο γάλα	% διαφορά για το αίγειο γάλα
C4:0 βουτυρικό	0,13	0,11	
C6:0 καπροϊκό	0,09	0,06	
C8:0 καπρυλικό	0,10	0,09	
C14:0 μυριστικό	0,32	0,34	
C16:0 παλμιτικό	0,91	0,88	

C18:0 στεαρικό	0,44	0,40	
C6-14 συνολικά MCT	0.89	0.61	+ 46
C4-18 συνολικά SAFA	2.67	2.08	+28
C16:1 παλμιτολεϊκό	0,08	0,08	
C18:1 ολεϊκό	0,98	0,84	
C16:1-22:1 συνολικά MUFA	1,11	0,96	+16
C18:2 λινολεϊκό	0,11	0,08	
C18:3 λινολενικό	0,04	0,05	
C18:2-18:3 συνολικά PUFA	0,15	0,12	+25

Πηγή: (Posati & Orr, 1976).

- ❖ Το αίγιο γάλα περιέχει σημαντικά ποσοστά βιταμινών (βιταμίνη A, D, B₁, B₂, B₁₂, C και νικοτινικό οξύ) και διαφόρων ιχνοστοιχείων (ασβέστιο, φωσφόρος, μαγνήσιο, μαγγάνιο, χαλκός, ψευδάργυρος) που συμβάλλουν ευεργετικά στην υγεία του ανθρώπου. Μάλιστα, οι βιταμίνες D, B₁, B₂, C και το νικοτινικό οξύ απαντώνται στο αίγιο γάλα σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με το βόειο (πίνακας 13) καθιστώντας το έτσι ως ένα τρόφιμο υψηλής βιολογικής αξίας (Pandya & Ghodke, 2007).

Πίνακας 13: Μέση περιεκτικότητα σε βιταμίνες σε βόειο, αίγιο και ανθρώπινο γάλα.

Βιταμίνες	Βόειο γάλα	Αίγιο γάλα	Γάλα ανθρώπου
Βιταμίνη A (IU/l)	1560	2074	1898
Βιταμίνη D (mg/l)	20	24	14
Θειαμίνη (B ₁)(mg/l)	0,44	0,68	0,16
Ριβοφλαβίνη (B ₂) (mg/l)	1,75	2,10	0,36
Νικοτινικό οξύ (mg/l)	0,94	2,70	1,47
Βιταμίνη B ₁₂ (mg/l)	0,043	0,006	0,03
Ασκορβικό οξύ (mg/l)	9,4	15,0	43,0

Πηγή: (Pandya & Ghodke, 2007).

- ❖ Το γίδινο γάλα περιέχει μικρότερο αριθμό αλλεργιογόνων συστατικών συγκριτικά με το αγελαδινό, γεγονός που ώθησε πολλές χώρες, όπως τη γείτονα Ιταλία, να το χρησιμοποιούν προς αντικατάσταση του βόειου για την αντιμετώπιση των τροφικών αλλεργιών και δυσανεξιών που προκαλούνται, ιδιαίτερα στα νεογνά και τα παιδιά, από την κατανάλωση βόειου γάλακτος (Bellioni-Businco *et al.*, 1999).

Στις μέρες μας, το συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για την παραγωγή ποιοτικών, υγιεινών και ασφαλών τροφίμων με απώτερο στόχο τη διασφάλιση της δημόσιας υγείας οδήγησε στην εφαρμογή πολλών μεθόδων ελέγχου και πρόληψης των πιθανών κινδύνων στα τρόφιμα. Ένας από τους σημαντικότερους χημικούς κινδύνους στα τρόφιμα και ιδιαίτερα στο γάλα και τα προϊόντα του θεωρείται η AFM₁. Σήμερα, σε εξετάσεις ρουτίνας, για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της AFM₁ στο γάλα οι περισσότερες γαλακτοβιομηχανίες εφαρμόζουν την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA, ενώ η μέθοδος αναφοράς HPLC λαμβάνει χώρα μόνο σε περιοδικούς ελέγχους.

Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τόσο στην Ελλάδα όσο και σε άλλες χώρες τα δεδομένα που προκύπτουν σχετικά με την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση της AFM₁ στο γάλα να είναι αρκετά περιορισμένα. Επιπλέον, οι προσδιορισμοί που επιτυγχάνονται με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA, φαίνεται να επηρεάζονται συχνά από τα «φαινόμενα πλάσματος» που προκύπτουν λόγω της ταυτόχρονης παρουσίας ουσιών συγγενούς χημικής δομής με αυτήν της προσδιοριζόμενης, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο σε υπερτιμήσεις ή υποτιμήσεις της συγκέντρωσης του αναλύτη.

Λαμβάνοντας υπόψη, λοιπόν, τις τεράστιες επιπτώσεις που έχει η κατανάλωση της αφλατοξίνης M₁ στη Δημόσια Υγεία, την συνεχώς αυξανόμενη παραγωγή αίγιου γάλακτος λόγω των σημαντικών του πλεονεκτημάτων έναντι του βόειου καθώς και τα περιορισμένα δεδομένα που προκύπτουν στο γάλα σχετικά με την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση της AFM₁ λόγω της εκτεταμένης χρήσης της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA, και γνωρίζοντας ότι μέχρι σήμερα (σύμφωνα με την πρόσφατη βιβλιογραφία) δεν έχει εξετασθεί η εξειδίκευση της μεθόδου στον προσδιορισμό της AFM₁ παρουσία της AFM₂ (Rubio *et al.*, 2009 & Fallah *et al.*, 2009 & Colak, 2007 & Ertas *et al.*, 2011 & Assem *et al.*, 2011 & Kamkar, 2008 & Çelik, 2005), κρίναμε σκόπιμο να προβούμε στην αξιολόγηση της παραμέτρου αυτής στα εμπορικά σκευάσματα της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA -ELISA kitsits- που εξετάστηκαν.

Η αξιολόγηση έγινε ως προς την εκτίμηση της ακρίβειας (σχετική τυπική απόκλιση επί τοις εκατό, ολικό σφάλμα και ποσοστό ανάκτησης), της ειδικότητας (ποσοστό ανάκτησης AFM₁ παρουσία συσχετίσιμων συγκεντρώσεων AFM₂) και της επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων που εμφανίζουν τα αντιδραστήρια της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της αφλατοξίνης M₁ στο αίγαιο γάλα.

2.2. ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Για την εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής χρησιμοποιήθηκαν 2 λίτρα αίγιου γάλακτος, τα οποία ελήφθησαν από τη βιομηχανία γάλακτος «ΔΕΛΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ Α.Ε.» περιοχής Συδινής Ν. Ξάνθης. Από το αρχικό αυτό δείγμα χωρίστηκαν 100ml τα οποία εστάλησαν σε διαπιστευμένο εργαστήριο προς ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της AFM₁ με τη μέθοδο αναφοράς HPLC, ενώ το υπόλοιπο δείγμα καταψύχθηκε στους -80°C. Η συγκέντρωση AFM₁ που υπολογίστηκε από το εργαστήριο ήταν 5ng/l. Το γάλα 2 ημέρες πριν από την ημερομηνία εκτέλεσης του πειράματος μεταφέρθηκε σε συνθήκες ψύξης για απόψυξη, ενώ 1-2 ώρες πριν από την ανάλυση όλα τα αντιδραστήρια μεταφέρθηκαν σε συνθήκες περιβάλλοντος (20-25°C). Έπειτα, από το αρχικό συνολικό δείγμα παρασκευάστηκαν 22 φιαλίδια γάλακτος των 30ml στα οποία έγινε εμβολιασμός AFM₁ και AFM₂ ως εξής:

- ✓ Σε 5 φιαλίδια έγινε εμβολιασμός AFM₁ με συγκεντρώσεις 12.5, 25, 50, 75 και 100ng/l.
- ✓ Σε 5 φιαλίδια έγινε εμβολιασμός AFM₁ με συγκεντρώσεις 12.5, 25, 50, 75 και 100ng/l και AFM₂ με συγκεντρώσεις 12.5, 25, 50, 75 και 100ng/l αντίστοιχα.
- ✓ Οι παραπάνω εμβολιασμοί διενεργήθηκαν εις διπλούν για τον έλεγχο της ακρίβειας της μεταφοράς των συγκεντρώσεων.
- ✓ Δύο φιαλίδια δεν υποβλήθηκαν σε εμβολιασμό για να χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρες (blank).

Η επιλογή των ανωτέρω συγκεντρώσεων βασίστηκε στην απαίτηση της συμμετρικής κάλυψης της περιοχής εργασίας στο 50-150%. Στην παρούσα μελέτη, ως περιοχή εργασίας ορίζεται το MRL, δηλαδή τα 50ng/l AFM₁.

Κατόπιν, καθένα από τα φιαλίδια αυτά διαμοιράστηκε σε 3 φιαλίδια των 10ml για κάθε εταιρεία με αποτέλεσμα η κάθε εταιρεία να έχει από 22 φιαλίδια των 10ml με τις εξής συγκεντρώσεις αφλατοξινών:

- ✓ 10 φιαλίδια με 17.5, 30, 55, 80 και 105ng/l AFM₁ ως τελικές συγκεντρώσεις μετά την προσθήκη.
- ✓ 10 φιαλίδια με 17.5, 30, 55, 80 και 105ng/l AFM₁ ως τελικές συγκεντρώσεις παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AFM₂.
- ✓ 2 φιαλίδια (απουσία AFM₁) που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (blank) με τελική συγκέντρωση 5 ng/l AFM₁ (αρχική συγκέντρωση προσδιοριζόμενη με τη μέθοδο αναφοράς HPLC).

Στη συνέχεια, ακολούθησε η φυγοκέντρωσή τους σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του κάθε κατασκευαστή οίκου (βλέπε παράρτημα) για διαχωρισμό της υπερκείμενης λιπώδους στιβάδας από την υποκείμενη υδατική, η οποία τελικά χρησιμοποιήθηκε στη δοκιμασία. Κατά τη διάρκεια της συνολικής πειραματικής διαδικασίας τα δείγματα παρέμεναν προστατευμένα από το φως προς αποφυγή της αδρανοποίησης των AFM₁ και AFM₂.

2.3. ΥΛΙΚΑ

2.3.1. Συσκευές και όργανα

- Μηχάνημα πλύσης πλακών ELISA PW 40 SANOFI
- ELISA reader PR 2100 SANOFI
- Φυγόκεντρος EPPENDORF 5810R
- Αναδευτήρας πλακών HIELDORPH TITRAMAX 1000
- Ομογενοποιητής GRANDBIO PV1
- Διακριβωμένη πολυκάναλη πιπέτα 8 θέσεων 30-300ml BRAND TRANSFERPETTE
- Διακριβωμένες πιπέτες μεταβλητού όγκου BIOHIT και PROLINE για εμβολιασμό 12,5/ 25/ 50/ 75 και 100ng/l AFM₁ και AFM₂
- Πλάκες μικροτιτλοδότησης ELISA 96 βοθρίων των εταιρειών “Biotica”, “Adams” και “Atropos”.

Κάθε εμπορική συσκευασία **ELISA AFLATOXIN M₁** είναι κατάλληλη για τον ποσοτικό προσδιορισμό AFM₁ σε δείγματα γάλατος και περιέχει τα εξής:

- Μία (1) πλάκα μικροτιτλοδότησης με 96 πηγάδια, επιστρωμένη με αντισώματα Αφλατοξίνης M₁.
- Έξι – επτά φιαλίδια με πρότυπα διαλύματα Αφλατοξίνης M₁ ανάλογα με τον κατασκευαστή-οίκο.
- Ένα φιαλίδιο που περιέχει ένζυμο σύζευξης AFM₁.
- Ένα χρωμογόνο διάλυμα.
- Ένα ρυθμιστικό διάλυμα σύνδεσης.
- Ένα φιαλίδιο με διάλυμα παύσης-τερματισμού.
- Ένα ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης.
- Ένα φιαλίδιο που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης δείγματος.

2.3.2. Αντιδραστήρια

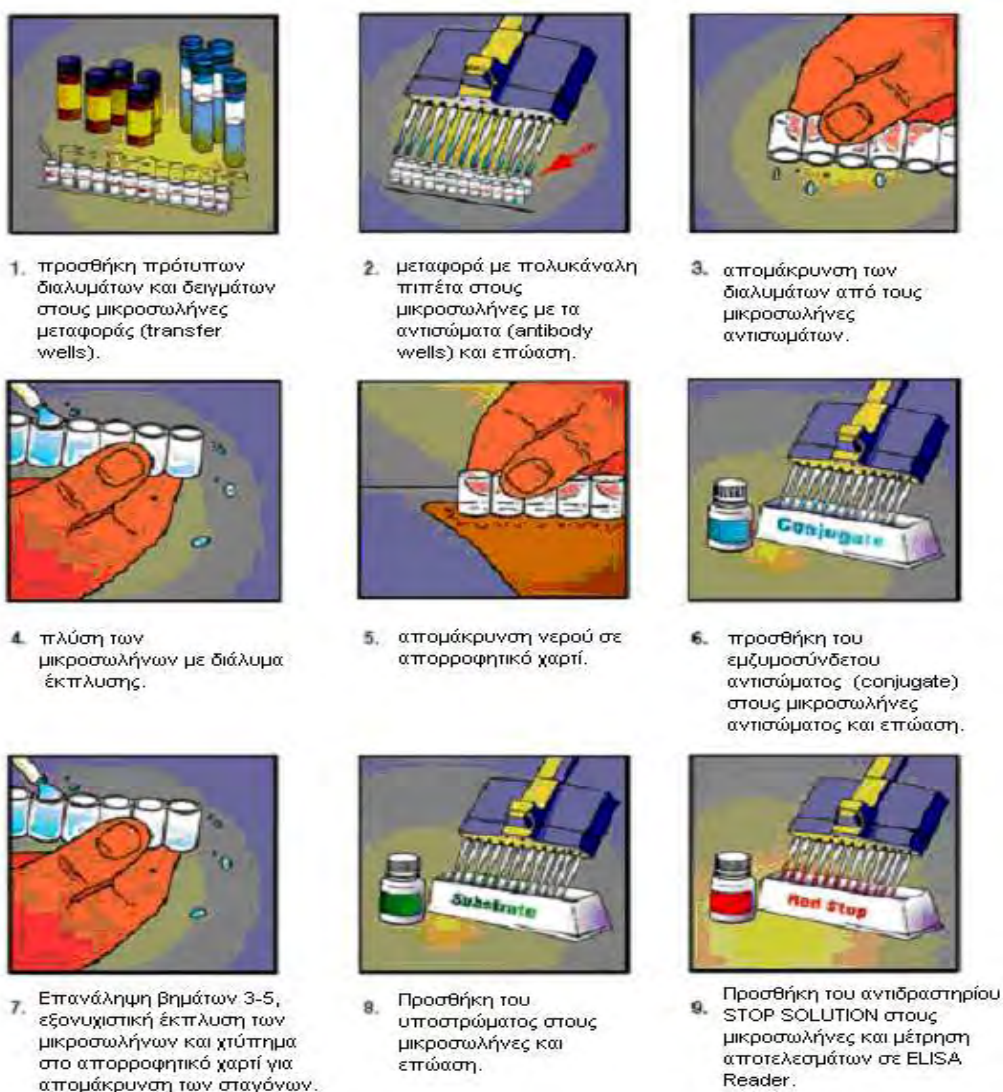
- Πρότυπο διάλυμα AFM₁ SUPELCO ANALYTICAL συγκέντρωσης 10μg/ml σε ακετονιτρίλιο
- Πρότυπο AFM₂ σε σκόνη FERMENTEK biotechnology
- Μεθανόλη SIGMAALDRICH METHANOL
- Απιονισμένο νερό

2.3.3. Εργαστηριακός εξοπλισμός

- Ογκομετρικές φιάλες, ογκομετρικοί κύλινδροι
- Κωνικές φιάλες
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Σωληνάρια erpendorf και στατώ σωληναρίων
- Σιφόνιο
- Πλαστική σφαίρα αναρρόφησης
- Αλουμινόχαρτο
- Πλαστικά γάντια μιας χρήσεως
- Βαμβακοφόροι στελεοί
- Απορροφητικό χαρτί
- Νεφροειδές
- Χρονόμετρο

2.4. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

Μετά την απομάκρυνση του λίπους, για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της AFM₁ ακολουθήθηκε μία γενική πορεία βημάτων, πλην όμως για τον κάθε κατασκευαστή οίκο λήφθηκαν υπόψη οι οδηγίες που υποδεικνύονται στα σχετικά εγχειρίδια (βλέπε παράρτημα). Σε γενικές γραμμές, τα στάδια ποσοτικού προσδιορισμού με τη μέθοδο ELISA sandwich είναι τα ακόλουθα (εικόνα 6):

- 
1. προσθήκη πρότυπων διαλυμάτων και δειγμάτων στους μικροσωλήνες μεταφοράς (transfer wells).
 2. μεταφορά με πολυκάναλη πιπίετα στους μικροσωλήνες με τα αντισώματα (antibody wells) και επώαση.
 3. απομάκρυνση των διαλυμάτων από τους μικροσωλήνες αντισωμάτων.
 4. πλύση των μικροσωλήνων με διάλυμα έκπλυσης.
 5. απομάκρυνση νερού σε απορροφητικό χαρτί.
 6. προσθήκη του εμζυμοσύνδευτου αντισώματος (conjugate) στους μικροσωλήνες αντισωμάτων και επώαση.
 7. Επανάληψη βημάτων 3-5, εξονυχιστική έκπλυση των μικροσωλήνων και χτύπημα στο απορροφητικό χαρτί για απομάκρυνση των σταγόνων.
 8. Προσθήκη του υποστρώματος στους μικροσωλήνες και επώαση.
 9. Προσθήκη του αντιδραστήριου STOP SOLUTION στους μικροσωλήνες και μέτρηση αποτελεσμάτων σε ELISA Reader.

Εικόνα 6: Γενικό σχήμα ποσοτικού προσδιορισμού με τη μέθοδο ELISA sandwich.

Όπως παρατηρούμε και στην εικόνα 6, στην ELISA sandwich τα αντισώματα για ένα συγκεκριμένο αντιγόνο προσκολλώνται σε μικροσωλήνες τιτλοδότησης. Στην συνέχεια, το δείγμα (που περιέχει το υπό ανίχνευση αντιγόνο) προστίθεται στο πλακίδιο και το τυχόν αντιγόνο δεσμεύεται στο αντίσωμα. Οι μη προσδεδεμένες πρωτεΐνες απομακρύνονται με πλύση, ενώ αργότερα ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για το αντιγόνο προστίθεται στο πλακίδιο. Το δεύτερο αυτό αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με ένζυμο (ενζυμοσύνδετο) και δεσμεύεται επίσης στο αντιγόνο. Όσα ενζυμοσύνδετα αντισώματα που δεν έχουν δεσμευτεί με αντιγόνο, ξεπλένονται και απομακρύνονται. Όταν τοποθετηθεί το κατάλληλο υπόστρωμα του ενζύμου επιτελείται μία ενζυμική αντίδραση που παράγει ένα ορατό σήμα (χρησιμοποιούνται χρωμογόνα υποστρώματα ή υποστρώματα φθορισμού, τα οποία έχουν υψηλότερη ευαισθησία και η ένταση του χρώματος είναι ευθέως ανάλογη της ποσότητας του αντιγόνου), το οποίο μετρείται φασματοφωτομετρικά για την εκτίμηση της συγκέντρωσης του αντιγόνου στο δείγμα.

3. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Για την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι εμπορικές συσκευασίες των εταιρειών «Biotica G. Samolada & Co», «Adams» και «Atropos», οι οποίες στο εξής για λόγους δεοντολογίας θα αναφέρονται μη αντιστοίχως με τα διακριτικά Α, Β και Γ.

Οι εργαστηριακές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, που διαθέτει αυτοματοποιημένη ELISA, ενώ η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε σύμφωνα με το στατιστικό πρόγραμμα ανάλυσης SPSS 16 με επίπεδο εμπιστοσύνης 95%.

Οι απορροφήσεις των δειγμάτων των εταιρειών «Α», «Β» και «Γ» ελήφθησαν στα 450nm.

Οι συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων των εμπορικών συσκευασιών των τριών εταιρειών συνοψίζονται στον πίνακα που ακολουθεί (πίνακας 14):

Πίνακας 14: Συγκεντρώσεις προτύπων διαλυμάτων (ng/l) των εταιρειών «Α», «Β» και «Γ».

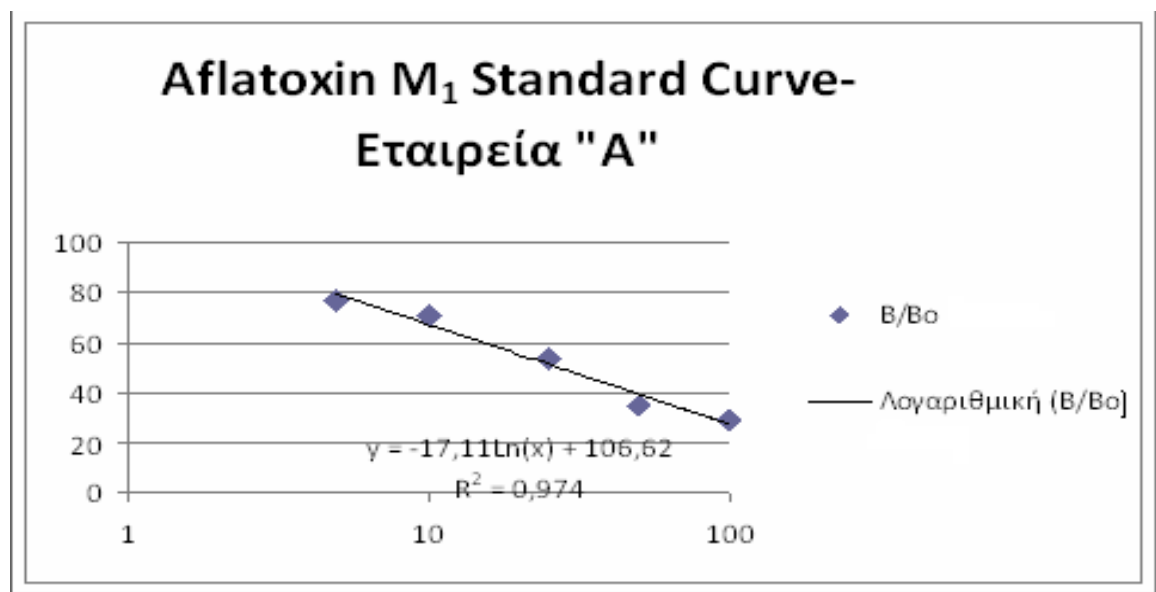
Πρότυπα διαλύματα	Εταιρεία «Α»	Εταιρεία «Β»	Εταιρεία «Γ»
STD1	0	0	6.25
STD2	5	5	12.5
STD3	10	10	25
STD4	25	20	50
STD5	50	40	100
STD6	100	80	200
STD7	250		

Στη συνέχεια, σύμφωνα με τις οδηγίες του κάθε κατασκευαστή-οίκου, οι τιμές των απορροφήσεων των πρότυπων διαλυμάτων (B) διαιρέθηκαν με την τιμή απορρόφησης του πρώτου πρότυπου διαλύματος (πρότυπο διάλυμα 0 ή zero standard) (B_0) και πολλαπλασιάστηκαν επί 100 με στόχο τον σχεδιασμό των πρότυπων καμπυλών και των εξισώσεών τους, οι οποίες αργότερα χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων της AFM₁ στα δείγματα. Στον πίνακα 15 δίνονται οι τιμές του λόγου των απορροφήσεων (B/ B_0) όπως προέκυψαν για τις εταιρείες «Α», «Β» και «Γ» αντίστοιχα.

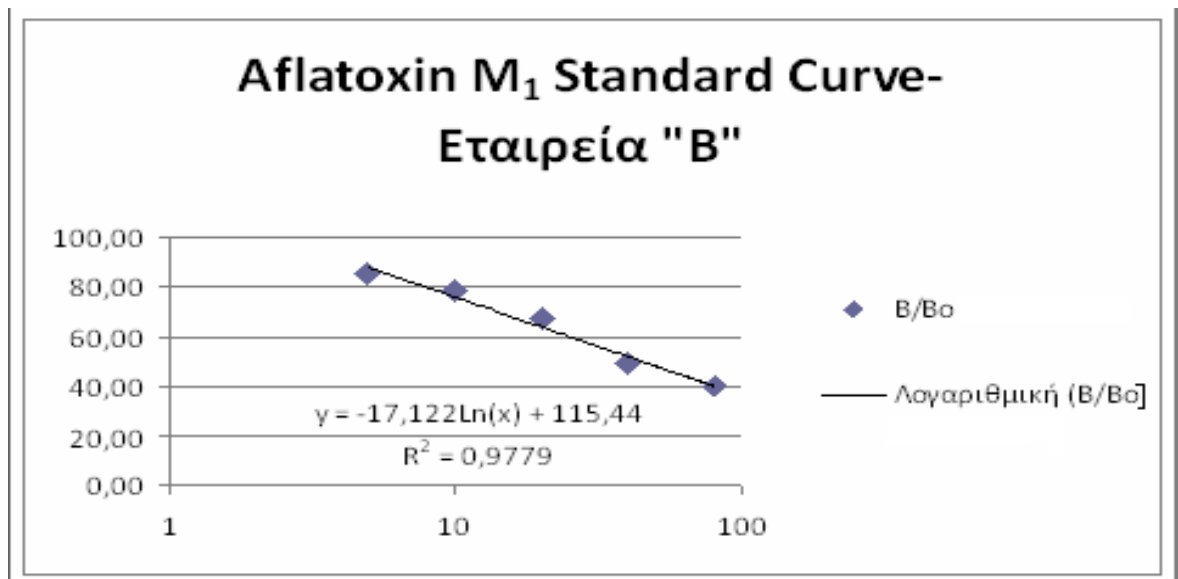
Πίνακας 15: Λόγος B/ B_0 για τις εταιρείες «Α», «Β» και «Γ».

Εταιρεία «Α»	B/ B_0	Εταιρεία «Β»	B/ B_0	Εταιρεία «Γ»	B/ B_0
5	77	5	85	6,25	97
10	71	10	78	12,5	85
25	54	20	67	25	70
50	35	40	49	50	44
100	29	80	40	100	28
250	21			200	18

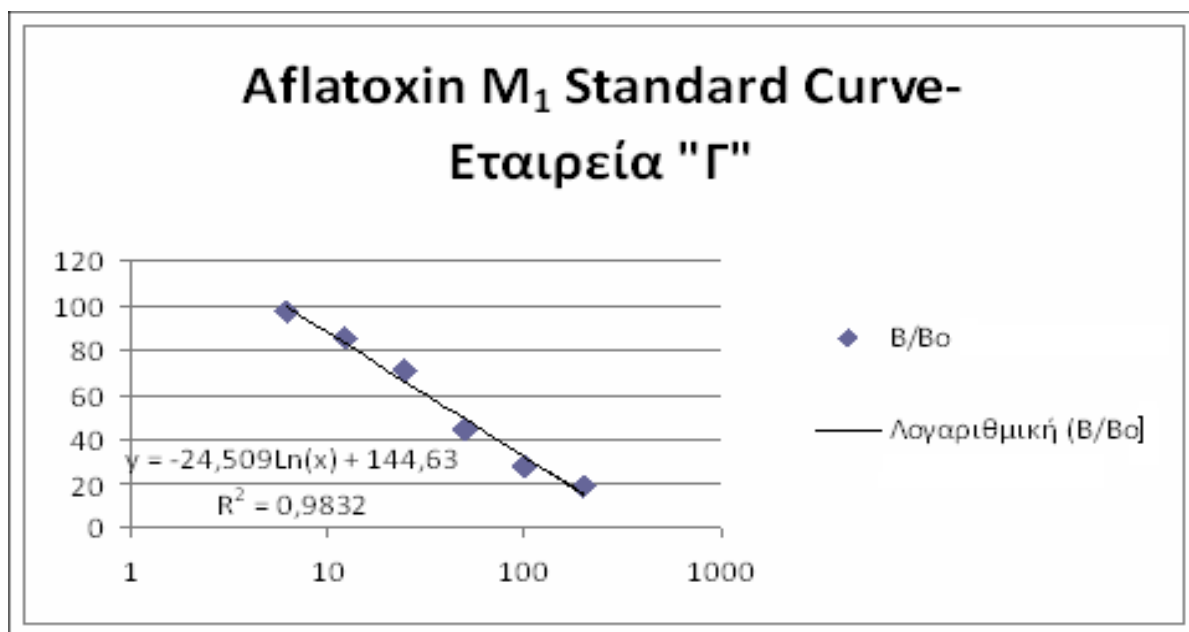
Στα διαγράμματα 1, 2 και 3 που ακολουθούν, παρατηρούνται οι καμπύλες των πρότυπων διαλυμάτων των εταιρειών «Α», «Β» και «Γ» αντίστοιχα, οι εξισώσεις των καμπυλών καθώς και οι συντελεστές συσχέτισης τους (r^2). Στον άξονα X δίνονται οι συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων ενώ στον άξονα Ψ οι τιμές του λόγου B/ B_0 . Όπως παρατηρούμε βάσει των εξισώσεων, οι καμπύλες των εταιρειών είναι λογαριθμικές με περιοχές γραμμικότητας, ενώ οι συντελεστές συσχέτισης κυμαίνονται από 0,974 έως 0,983. Για να είναι αποδεκτός ο συντελεστής συσχέτισης (r^2) απόκρισης-συγκεντρώσεων πρέπει να είναι μεγαλύτερος ή ίσος του 0,98.



Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη εταιρείας «Α».



Διάγραμμα 2: Πρότυπη καμπύλη εταιρείας «Β».



Διάγραμμα 3: Πρότυπη καμπύλη εταιρείας «Γ».

Με τη βοήθεια των καμπυλών και των εξισώσεών τους υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις της AFM₁ για κάθε εταιρεία ξεχωριστά με επίπεδο εμπιστοσύνης 95% μέσω του στατιστικού προγράμματος ανάλυσης SPSS 16 και με αξιοποίηση του κριτηρίου Tukey. Με τις υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις πραγματοποιήθηκε η συγκριτική επεξεργασία των αποτελεσμάτων για την αξιολόγηση των τριών εμπορικών συσκευασιών.

4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Προκειμένου να αξιολογηθούν συγκριτικά οι εμπορικές συσκευασίες ELISA, κρίθηκε απαραίτητο να προηγηθεί της αξιολόγησης η επικύρωση συγκεκριμένων παραμέτρων της μεθόδου. Κατά αυτόν τον τρόπο εκτιμήθηκε η κάθε εμπορική συσκευασία της ELISA για την ικανότητα συμμόρφωσής της με τα σχετικά χαρακτηριστικά επίδοσης και ακολούθησε η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Τα χαρακτηριστικά ποιότητας των εμπορικών συσκευασιών (και της μεθόδου) που εξετάστηκαν στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη ήταν τα ακόλουθα:

- Ακρίβεια
- Επαναληψιμότητα
- Ειδικότητα

4.2. ΑΚΡΙΒΕΙΑ

Σύμφωνα με το ISO 5725 η ακρίβεια ορίζεται ως το μέτρο της διασποράς μιας σειράς μετρήσεων από μέτρηση σε μέτρηση και μέσα στην ίδια σειρά μετρήσεων (within-run precision) και εκφράζεται με κάποιο στατιστικό μέτρο της διασποράς (π.χ. με την τυπική απόκλιση).

Στο πείραμά μας, η αληθής τιμή της εκάστοτε συγκεντρώσεως υπολογίστηκε προσθέτοντας την προσδιοριζόμενη με τη μέθοδο αναφοράς HPLC αρχική συγκέντρωση (5ng/l AFM₁) στη συγκέντρωση του εμβολιασμού.

Με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος SPSS 16 εφαρμόστηκε το κριτήριο Tukey για επίπεδο εμπιστοσύνης 95% και προέκυψαν οι τιμές του πίνακα 16. Από την τυπική απόκλιση του πίνακα 16 προσδιορίστηκε μετέπειτα και η σχετική τυπική απόκλιση (ή συντελεστής μεταβλητότητας-CV) βάσει της σχέσης

$$RSD = S / X_{\text{mean}}$$

Όπου,

RSD= η σχετική τυπική απόκλιση

S= η τυπική απόκλιση

X_{mean}= ο μέσος όρος των πειραματικών μετρήσεων της εκάστοτε συγκέντρωσης.

και η σχετική τυπική απόκλιση επί τοις εκατό (**RSD%**= (**S/ X_{mean}**) x 100).

Πίνακας 16: Υπολογισμός μέσου όρου πειραματικών τιμών, τυπικής απόκλισης, σφάλματος τυπικής απόκλισης και σχετικής τυπικής απόκλισης επί τοις εκατό για τις εταιρείες «Α», «Β» και «Γ» .

Εταιρεία	Αληθής τιμή	N	Μέσος όρος±SD	SD error	RSD%
«Α»	17,5	8	13,92±3,53	1,25	25
	30	8	37,42±6,41	2,27	17

	55	8	66,16±10,21	3,61	15
	80	8	85,22±10,41	3,68	12
	105	8	100,96±8,77	3,10	9
	TOTAL	40	60,74±32,92	5,20	54
«Β»	17,5	8	9,68±3,28	1,16	34
	30	8	28,74±6,84	2,42	24
	55	8	59,23±6,65	2,35	11
	80	8	73,00±10,18	3,60	14
	105	8	83,62±11,64	4,11	14
	TOTAL	40	50,85±29,06	4,59	57
«Γ»	17,5	8	4,11±0,88	0,31	21
	30	8	9,62±1,75	0,62	18
	55	8	31,37±3,39	1,20	11
	80	8	54,40±7,31	2,59	13
	105	8	84,20±5,47	1,93	7
	TOTAL	40	36,74±30,31	4,79	83

Η ακρίβεια μιας ποσοτικής μεθόδου ελέγχεται από την εφαρμογή της αναλυτικής μεθόδου σε μείγματα συστατικών (σε εμάς το γάλα), στα οποία έχουν προστεθεί γνωστές ποσότητες της προς προσδιορισμό ουσίας και ακολουθεί ο υπολογισμός του σφάλματος για κάθε δείγμα.

Για να προσδιορίσουμε το ολικό σφάλμα στις μετρήσεις των εταιρειών χρησιμοποιήσαμε την εξίσωση:

$$T = \frac{|X_{\text{mean}} - \mu|}{\mu} + 2s * 100\%$$

Όπου,

T= ολικό σφάλμα

$X_{\text{mean}} - \mu$ = συστηματικό σφάλμα (bias), μέτρο ορθότητας μεθόδου

S= τυπική απόκλιση μεθόδου, μέτρο επαναληψιμότητας.

Με την εφαρμογή της μαθηματικής αυτής σχέσης στα δεδομένα του πίνακα 16 λάβαμε τα εκατοστιαία ολικά σφάλματα στους ποσοτικούς προσδιορισμούς της AFM₁ των εταιρειών «Α», «Β» και «Γ», τα οποία συνοψίζονται στον πίνακα 17.

Πίνακας 17: Εκατοστιαίο ολικό σφάλμα ως προς τον προσδιορισμό της AFM₁ στα δείγματα.

Αληθείς τιμές (ng/l)	% Ολικό σφάλμα		
	Εταιρεία «Α»	Εταιρεία «Β»	Εταιρεία «Γ»
17,5	61	82	87
30	68	50	80
55	57	32	55
80	33	34	50
105	21	43	30

Στη συνέχεια, με την προσθήκη γνωστών ποσοτήτων αναλύτη στο δείγμα υπολογίστηκε η ανάκτηση, δηλαδή το ποσοστό της αληθούς συγκέντρωσης μιας ουσίας που ανακτάται κατά την αναλυτική διαδικασία.

Η ανάκτηση (Recovery-R), ως μέτρο της ακρίβειας, δίνεται από τη σχέση:

$$\% R = \frac{C_1 - C_0}{\Delta C} * 100 \text{ (αυστηρός τύπος) } \text{ ή }$$

$$\% R = \frac{C_1}{C_0 + \Delta C} * 100 \text{ (ελαστικός τύπος)}$$

Όπου,

$\%R$ = η ανάκτηση της μεθόδου

C_0 = η συγκέντρωση που προσδιορίστηκε στο δείγμα κατά την ανάλυσή του με τη μέθοδο αναφοράς HPLC, δηλαδή τα 5ng/l AFM₁

C_1 = η συγκέντρωση που υπολογίστηκε από τα αντιδραστήρια

ΔC = η συγκέντρωση AFM₁ που εμβολιάστηκε, χωρίς να επέλθει μεταβολή του όγκου του δείγματος.

Για τον υπολογισμό της ανάκτησης των συγκεντρώσεων της AFM₁ των δειγμάτων μας χρησιμοποιήθηκε ο (ελαστικός) τύπος και τα αποτελέσματα που λήφθηκαν παρατίθενται στον πίνακα 18.

Πίνακας 18: % Ανάκτηση εταιρειών «Α», «Β» και «Γ» ως προς τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων AFM₁ στα δείγματα.

Αληθείς τιμές (ng/l)	% Ανάκτηση		
	Εταιρεία «Α»	Εταιρεία «Β»	Εταιρεία «Γ»
17,5	80	55	23
30	125	96	32
55	120	108	57
80	107	91	68
105	96	80	80

Επομένως, η ακρίβεια μπορεί να παρουσιασθεί με 2 τρόπους:

- Ως εκατοστιαία ανάκτηση (%Recovery) της γνωστής ποσότητας του αναλύτη που προστέθηκε στο δείγμα.
- Ως η διαφορά μεταξύ του μέσου όρου των τιμών που βρέθηκαν από την εφαρμογή της ελεγχόμενης μεθόδου σε ένα δείγμα και της παραδεκτής αληθούς

τιμής (accepted true value) (τιμή του δείγματος αναφοράς ή τιμή που βρέθηκε από την εφαρμογή μιας ανεξάρτητης μεθόδου) μαζί με τα όρια εμπιστοσύνης.

Για τη σύγκριση της πειραματικής μέσης τιμής (X_{mean}) και της πραγματικής τιμής (μ) χρησιμοποιώντας τις δοκιμασίες Student υπολογίστηκαν οι πειραματικές τιμές του στατιστικού στοιχείου t (t_{exp}), από την ακόλουθη σχέση:

$$t_{\text{exp}} = \frac{|\mu - X_{\text{mean}}| \sqrt{N}}{S}$$

Όπου,

t_{exp} = η πειραματική τιμή του στατιστικού στοιχείου t

μ = η πραγματική (αποδεκτή) μέση τιμή

N = ο αριθμός των μετρήσεων (σε εμάς $N=8$) και

S = η τυπική απόκλιση που υπολογίστηκε με n βαθμούς ελευθερίας.

Με την εφαρμογή της ανωτέρω μαθηματικής σχέσης προκύπτουν τα δεδομένα που συνοψίζονται στον πίνακα 19.

Πίνακας 19: Τιμές t_{exp} των εμπορικών σκευασμάτων των 3 εταιρειών.

Αληθείς τιμές (ng/l)	t_{exp}		
	Εταιρεία «Α»	Εταιρεία «Β»	Εταιρεία «Γ»
17,5	2,870	6,747	43,061
30	3,276	0,521	32,957
55	3,093	1,800	19,727
80	1,419	1,946	9,911
105	1,304	5,198	10,761

Στη συνέχεια, οι τιμές t_{exp} συγκρίθηκαν σύμφωνα με τις θεωρητικές τιμές t_{theor} οι οποίες δίνονται από σχετικό πίνακα του ISO 5725 βάσει των βαθμών ελευθερίας ν . Στη δική μας μελέτη, οι βαθμοί ελευθερίας είναι $\nu=N-1=8-1=7$ και σε στάθμη εμπιστοσύνης 95% η θεωρητική τιμή t_{theor} είναι 2,365.

Στις περιπτώσεις όπου $t_{exp} > t_{theor}$ η μηδενική υπόθεση απορρίπτεται στη δεδομένη στάθμη εμπιστοσύνης (95%), δηλαδή η μέση τιμή θεωρείται διαφορετική από την πραγματική (ή αληθή τιμή) και τούτο μπορεί να αποδοθεί σε ανεπάρκεια (συστηματικό σφάλμα) της εξεταζόμενης μεθόδου. Σε αντίθετη περίπτωση, οι όποιες διαφορές θεωρούνται απλώς τυχαίες.

4.3. ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ

Ως επαναληψιμότητα της μεθόδου ορίζεται το μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων διαδοχικών ελέγχων στο ίδιο δείγμα, που εκτελούνται κάτω από τις ίδιες συνθήκες, δηλ. ίδια μέθοδος ελέγχου, ίδιος αναλυτής, ίδια συσκευή, ίδιο εργαστήριο και βραχύ χρονικό διάστημα. Στη δική μας μελέτη σε κάθε ELISA kit η κάθε συγκέντρωση εξετάστηκε 4 φορές, ενώ όλο το πείραμα διεξήχθη εις διπλούν για τον έλεγχο της ακρίβειας της μεταφοράς των συγκεντρώσεων.

Η επαναληψιμότητα μιας μεθόδου υπολογίζεται από τη σχέση:

$$R \text{ (Repeatability)} = 2,8 \times S$$

Όπου,

R: η επαναληψιμότητα της μεθόδου

S ή SD= η τυπική απόκλιση

Εφαρμόζοντας τη σχέση αυτή προέκυψαν οι ακόλουθες τιμές επαναληψιμότητας (πίνακας 20).

Πίνακας 20: Τιμές επαναληψιμότητας.

Αληθείς τιμές (ng/l)	R		
	Εταιρεία «Α»	Εταιρεία «Β»	Εταιρεία «Γ»
17,5	10	9	2
30	18	19	5
55	29	19	9
80	29	29	20
105	25	33	15

4.4. ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Μια μέθοδος είναι πλήρως ειδική (specific) για έναν αναλύτη, όταν η συγκέντρωσή του μπορεί να προσδιορισθεί με ακρίβεια χωρίς επίδραση από τα άλλα συστατικά του δείγματος. Τα άλλα συστατικά δεν παράγουν αναλυτικό σήμα. Ο έλεγχος της ειδικότητας συνίσταται στην αξιολόγηση της αναλυτικής μεθόδου να διακρίνει τον αναλύτη από γνωστές προσμίξεις, υπολλείματα πρώτων υλών της σύνθεσης, μεταβολίτες, προϊόντα διασπάσεως και συστατικά του μητρικού υλικού του δείγματος. Δηλαδή, στηρίζεται στην επιβεβαίωση της ικανότητας διάκρισης με λήψη θετικών αποτελεσμάτων από δείγματα που περιέχουν τον αναλύτη (πρότυπα διαλύματα), σε συνδυασμό με αρνητικά αποτελέσματα από δείγματα που δεν περιέχουν τον αναλύτη. Για τον έλεγχο της ειδικότητας, στην παρούσα διατριβή, σε δείγμα με αρχική συγκέντρωση 5ng/l AFM₁ πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός AFM₁ σε τέτοιες συγκεντρώσεις, ώστε να εξετασθεί η ικανότητα των αντιδραστηρίων να ανιχνεύουν και να ποσοτικοποιούν (ποσοστό ανάκτησης) τις τελικές συγκεντρώσεις παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AFM₂ (ουσίας χημικά συγγενούς με την AFM₁). Οι τελικές συγκεντρώσεις εμβολιασμού των δειγμάτων ήταν 17.5, 30, 55, 80 και 105ng/l AFM₁.

Με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος ανάλυσης SPSS 16 και το κριτήριο Tukey για επίπεδο εμπιστοσύνης 95% προέκυψαν οι τιμές του πίνακα 21 σχετικά με τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης AFM₁ μετά την προσθήκη της AFM₂.

Πίνακας 211:Υπολογισμός μέσου όρου πειραματικών τιμών, τυπικής απόκλισης, σφάλματος τυπικής απόκλισης και σχετικής τυπικής απόκλισης επί τοις εκατό για τις εταιρείες «Α», «Β» και «Γ» μετά την προσθήκη της AFM₂.

Εταιρεία	Αληθής τιμή	N	Μέσος όρος±SD	SD error	RSD%
«Α»	17,5	8	15,71±3,70	1,31	24
	30	8	37,76±8,66	3,06	23
	55	8	61,72±5,88	2,08	10
	80	8	78,39±9,45	3,34	12

	105	8	90,77±9,40	3,32	10
	TOTAL	40	56,87±28,50	4,51	50
«Β»	17,5	8	13,07±3,54	1,25	27
	30	8	31,15±6,77	2,39	22
	55	8	51,02±5,81	2,06	11
	80	8	57,87±9,35	3,31	16
	105	8	62,35±6,34	2,20	10
	TOTAL	40	43,09±19,68	3,11	46
«Γ»	17,5	8	4,30±1,04	0,37	24
	30	8	10,31±3,88	1,37	38
	55	8	24,03±3,19	1,13	13
	80	8	50,51±5,29	1,87	10
	105	8	73,09±8,07	2,85	11
	TOTAL	40	32,45±26,55	4,20	82

Στη συνέχεια, προσδιορίστηκαν το εκατοστιαίο ολικό σφάλμα, η % ανάκτηση και η επαναληψιμότητα στους προσδιορισμούς, όπως και προηγουμένως, και τα αποτελέσματα των μετρήσεων συνοψίζονται στους πίνακες 22, 23 και 24 αντίστοιχα.

Πίνακας 222: Εκατοστιαίο ολικό σφάλμα ως προς τον προσδιορισμό της AFM₁ στα δείγματα παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AFM₂.

Αληθείς τιμές (ng/l)	% Ολικό σφάλμα		
	Εταιρεία «Α»	Εταιρεία «Β»	Εταιρεία «Γ»
17,5	53	66	87
30	84	49	92

55	34	28	68
80	26	51	50
105	31	53	46

Πίνακας 233: % Ανάκτηση εταιρειών «Α», «Β» και «Γ» ως προς τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων AFM₁ στα δείγματα παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AFM₂.

Αληθείς τιμές (ng/l)	% Ανάκτηση		
	Εταιρεία «Α»	Εταιρεία «Β»	Εταιρεία «Γ»
17,5	90	75	25
30	126	104	34
55	112	93	44
80	98	72	63
105	86	59	70

Πίνακας 244: Τιμές επαναληψιμότητας μετά την προσθήκη της AFM₂.

Αληθείς τιμές (ng/l)	Επαναληψιμότητα		
	Εταιρεία «Α»	Εταιρεία «Β»	Εταιρεία «Γ»
17,5	10	10	3
30	24	19	11
55	16	16	9
80	26	26	15
105	26	18	23

Έπειτα, για τον έλεγχο της ειδικότητας των kits «Α», «Β» και «Γ» έγινε σύγκριση των % ανακτήσεων των συγκεντρώσεων της AFM₁ απουσία και παρουσία της AFM₂ και έλεγχος της διακύμανσής τους. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα 25.

Πίνακας 255: Διαφορά ποσοστών ανάκτησης παρουσία και απουσία AFM₂ στα δείγματα.

Αληθείς τιμές (ng/l)	Διακύμανση % Ανάκτησης		
	Εταιρεία «Α»	Εταιρεία «Β»	Εταιρεία «Γ»
17,5	10	20	2
30	1	8	2
55	8	15	13
80	9	19	5
105	10	21	10

4.5. ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ – ΠΕΡΙΟΧΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ

Όπως παρατηρούμε στα διαγράμματα απόκρισης-συγκέντρωσης των προτύπων καμπυλών (διαγράμματα 1-3), η εξίσωση των καμπυλών είναι λογαριθμική με περιοχές γραμμικότητας. Για την επιλογή της περιοχής γραμμικότητας χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη τιμών τουλάχιστον 4 προτύπων (απορρόφηση-συγκέντρωση). Οι συγκεντρώσεις των 4 προτύπων που επιλέχθηκαν καλύπτουν συμμετρικά το 50-150% της περιοχής εργασίας, η οποία στην παρούσα μελέτη είναι το MRL, δηλαδή τα 50ng/l AFM₁.

Παρουσιάζοντας συνοπτικά τα αποτελέσματα των χαρακτηριστικών για τα εμπορικά σκευάσματα «Α», «Β» και «Γ» λαμβάνουμε τον πίνακα 26.

Πίνακας 266: Συνοπτική παρουσίαση των χαρακτηριστικών ποιότητας των εταιρειών «Α», «Β» και «Γ».

ΕΤΑΙΡΕΙΑ «Α»					ΕΤΑΙΡΕΙΑ «Β»				ΕΤΑΙΡΕΙΑ «Γ»			
ΑΛΗΘΕΙΣ ΤΙΜΕΣ	Mean	% R	R	% RSD	Mean	% R	R	% RSD	Mean	% R	R	% RSD
AFM ₁ : 17,5ng/l	13,92	80	10	25	9,68	55	9	34	4,11	23	2	21
AFM ₁ : 30ng/l	37,42	125	18	17	28,74	96	19	24	9,62	32	5	18
AFM ₁ : 55ng/l	66,16	120	29	15	59,23	108	19	11	31,37	57	9	11
AFM ₁ : 80ng/l	85,22	107	29	12	73,00	91	29	14	54,40	68	20	13
AFM ₁ : 105ng/l	100,96	96	25	9	83,62	80	33	14	84,20	80	15	7
AFM ₁ : 17,5ng/l παρουσία AFM ₂	15,71	90	10	24	13,07	75	10	27	4,30	25	3	24
AFM ₁ : 30ng/l παρουσία AFM ₂	37,76	126	24	23	31,15	104	19	22	10,31	34	11	38
AFM ₁ : 55ng/l παρουσία AFM ₂	61,72	112	16	10	51,02	93	16	11	24,03	44	9	13
AFM ₁ : 80ng/l παρουσία AFM ₂	78,39	98	26	12	57,87	72	26	16	50,51	63	15	10
AFM ₁ : 105ng/l παρουσία AFM ₂	90,77	86	18	10	62,35	59	18	10	73,09	70	23	11

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν κατά τον προσδιορισμό της μικρότερης από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις εμφανίζουν μεγαλύτερες τιμές ολικού σφάλματος (μεγαλύτερη διαφορά από την πραγματική τιμή) σε όλα τα εμπορικά σκευάσματα που εξετάστηκαν. Παρατηρήσαμε ότι στη μικρότερη (17,5ng/l) και την μεγαλύτερη συγκέντρωση (105ng/l), όλα τα kits παρουσίαζαν χαμηλή ακρίβεια λόγω της υποτίμησης που εμφάνιζαν στον προσδιορισμό της AFM₁. Σε περιοχές γύρω από τις τιμές των θεσπισμένων από την ΕΕ ορίων (30, 50 και 80 ng/l), η ακρίβεια εξαρτιόταν από το kit ελέγχου. Έτσι, το kit «Α» αποδείχθηκε υψηλότερης ακρίβειας για τον προσδιορισμό αυτών των συγκεντρώσεων, το kit «Β» είχε καλή ακρίβεια μόνο στις συγκεντρώσεις των 55ng/l και των 30ng/l, ενώ στη συγκέντρωση 80ng/l παρουσίαζε, όπως και το «Γ», μειωμένη ακρίβεια αφού και τα δύο οδήγησαν σε υποτίμηση των ελεγχόμενων συγκεντρώσεων.

Σχετικά με την προσδιοριζόμενη RSD%, οι τιμές εξαρτώνταν από τις συγκεντρώσεις εμβολιασμού και το εξεταζόμενο kit. Σε στάθμη εμπιστοσύνης 95%, για την εταιρεία «Α» οι τιμές (εξαιρούμενης της μικρότερης συγκέντρωσης) κυμαίνονταν μεταξύ 9 και 17 γεγονός που αποδεικνύει ικανοποιητική επαναληψιμότητα αφού σύμφωνα με την κείμενη βιβλιογραφία (Botsoglou *et al.*, 2000 & Rubio *et al.*, 2009) τιμές RSD% που κυμαίνονται μεταξύ 2 και 20 % θεωρούνται αποδεκτές. Το kit «Β» εμφάνιζε ικανοποιητική επαναληψιμότητα μόνο στις συγκεντρώσεις 55, 80 και 105ng/l AFM₁ καθώς έδωσε τιμές RSD% που κυμαίνονταν από 11 έως 14 ενώ για τις συγκεντρώσεις 17,5 και 30ng/l AFM₁ η επαναληψιμότητα ήταν κακή (34 και 24 RSD% αντίστοιχα). Τέλος, το kit «Γ» εξαιρούμενης της μικρότερης συγκέντρωσης στην οποία το RSD% ήταν σχετικά οριακό (RSD%=21), εμφάνισε την καλύτερη επαναληψιμότητα με διαβάθμιση τιμών από 7 έως 18.

Τα αποτελέσματά μας για τα kits «Α» και «Β» βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα άλλων ερευνητών οι οποίοι έχουν προσδιορίσει τιμές μεταξύ 4,9 και 18,9% (εξαιρούμενης της μικρότερης συγκέντρωσης εμβολιασμού).

Οι τιμές των % ανακτήσεων κατά τον εμβολιασμό δειγμάτων γάλακτος με συγκεντρώσεις 12,5 έως 100ng/kg και σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95% για την εταιρεία

«Α» κυμαίνονταν από 80 έως 125%, για την εταιρεία «Β» από 55 έως 108% και για την εταιρεία «Γ» από 23 έως 80%. Για συγκεντρώσεις εμβολιασμού γύρω από το MRL η εταιρεία «Α» παρουσίαζε υπερτίμηση στους προσδιορισμούς, η εταιρεία «Β» παρουσίαζε υποτίμηση στη συγκέντρωση των 30ng/kg και υπερτίμηση στη συγκέντρωση των 55 και 80ng/l, ενώ η εταιρεία «Γ» στις περισσότερες συγκεντρώσεις παρουσίαζε υποτίμηση. Ωστόσο, στη μεγαλύτερη συγκέντρωση εμβολιασμού (100ng/kg) όλα τα kits εμφάνιζαν υποτίμηση στους προσδιορισμούς της AFM₁. Αυτό σημαίνει ότι από τα εξεταζόμενα kits, το «Α» είναι ικανό να χρησιμοποιηθεί με τη μεγαλύτερη ακρίβεια για την ποσοτικοποίηση AFM₁ σε επίπεδα κοντά στα επιτρεπτά όρια της ΕΕ, ενώ ακολουθεί το «Β» με σχετικά μικρή διαφορά, όπως αυτή αποτυπώθηκε από τα εξεταζόμενα ποιοτικά χαρακτηριστικά.

Μετά την προσθήκη της AFM₂ η % ανάκτηση του kit «Α» στον προσδιορισμό της AFM₁ παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AFM₂ κυμαίνονταν από 86-90%, στο kit «Β» από 59-104% και στο kit «Γ» από 25-70%. Το kit «Α» παρουσίαζε υποτίμηση στους προσδιορισμούς των συγκεντρώσεων 17,5 και 105ng/l, ενώ σε περιοχές κοντά στο MRL εμφάνιζε μικρή υπερτίμηση. Αντίστοιχη ήταν και η κατάσταση που διαμορφώθηκε κατά τους προσδιορισμούς με χρήση του kit «Β». Ωστόσο, στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης σε περιοχές κοντά στα ανώτατα από την ΕΕ θεσπισμένα νομοθετικά όρια (55ng/l), το kit «Β» εμφάνιζε σχετικά μικρή υποτίμηση (93%). Τέλος, το kit «Γ» παρουσίαζε υποτίμηση σε όλους τους προσδιορισμούς.

Σχετικά με την προσδιοριζόμενη RSD%, σε στάθμη εμπιστοσύνης 95%, όλα τα kits με εξαίρεση τις δύο χαμηλότερες συγκεντρώσεις εμφάνιζαν τιμές οι οποίες είναι αποδεκτές και δηλώνουν καλή επαναληψιμότητα.

Η διακύμανση των ποσοστών ανάκτησης στους προσδιορισμούς της AFM₁ απουσία και παρουσία της AFM₂ μεταβλήθηκε από 1 έως και 10 μονάδες για το kit «Α», από 8 έως και 21 μονάδες για το kit «Β» και από 2 έως 13 μονάδες για το kit «Γ» παρουσία συγκρίσιμων συγκεντρώσεων της AFM₂.

Κρίνοντας με βάση της διαφοροποιημένες τιμές στα ποσοστά ανάκτησης της AFM₁ κατά την παρουσία συγκρίσιμων συγκεντρώσεων της AFM₂ η ειδικότητα των εξεταζόμενων kits δεν ήταν βέλτιστη, αξίζει να σημειωθεί ότι με βάση την βιβλιογραφία που μας είναι γνωστή είναι η πρώτη φορά που διενεργείται ο έλεγχος της παραμέτρου αυτής. Ωστόσο, η εκτιμώμενη χαμηλή ειδικότητα έχει αξία μόνο για την εκτίμηση της

επικύρωσης της μεθόδου, καθώς ανάλογες συγκεντρώσεις AFM₂ δεν αναμένεται να βρεθούν σε πραγματικά τρόφιμα.

Λαμβάνοντας υπόψη την πιθανή αύξηση των συγκεντρώσεων της AFM₁ (Prandini *et al.*, 2009) κατά την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων απαιτείται θέσπιση ορίων και επέκταση αναλύσεων ελέγχου σε δείγματα γαλακτοκομικών προϊόντων.

Διεθνής

1. **Acamovic, T., Stewart, C.S. & Pennycott, T.W.**, *POISONOUS PLANTS AND RELATED TOXINS*, CABI Publishing, 2004, pp. 134-140
2. **Aman, J.** “Reduction of Aflatoxin M_1 in Milk Using Hydrogen Peroxide and Hydrogen peroxide Plus Heat Treatment”, **Journal of Veterinary Medicine**, May 2010, 39(9): 692-694
3. **Applebaum, R.S. & Marth, E.H.** “Fate of aflatoxin M_1 in cottage cheese”, **Journal of Food Protection**, 1982, 45: 903-904
4. **Applebaum, R.S., Brackett, R.E., Wiseman, D.W. & Marth, E.H.** “Response of dairy cows to dietary aflatoxin: feed intake and yield, toxin content and quality milk of cows treated with pure and impure aflatoxin”, **Journal of Dairy Science**, 1982, 65(8): 1503-1508
5. **Assem, E., Mohamad, A. & Oula E.A.** “A survey on the occurrence of aflatoxin M_1 in raw and processed milk samples marketed in Lebanon”, **Food Control**, December 2011, 22(12): 1856-1858
6. **Bellioni-Busincio, B., Paganelli, R., Lucenti, P., Giampietro, P.G., Perborn, H. & Busincio, L.** “Allergenicity of goat’s milk in children with cow’s milk allergy”, **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, June 1999, 103(6): 1191-4
7. **Biancardi, A.** “Determination of aflatoxin M_1 residues in milk: a comparative assessment of ELISA and IAC-HPLC Methods”, **Industrie Alimentari**, July-August 1997, 36(361): 870–876
8. **Cannas, A. & Pulina, G.**, *Dairy Goats Feeding and Nutrition*, CAB International, 2008, p. 18
9. **Çelik, T.H., Sarimehmetoğlu, B. & Küplülü, Ö.** “Aflatoxin M_1 contamination in pasteurised milk”, **VETERINARSKI ARHIV.**, 2005, 75(1): 57-65
10. **CFP/EFSA/FEEDAP** “Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety”, December 2009, pp. 1-192
11. **Chen, C.Y., Li, W.J. & Peng, K.Y.** “Determination of Aflatoxin M_1 in Milk and Milk Powder Using High-Flow Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry”, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, November 2005, 53(22): 8474–8480
12. **Cigic, I.K. & Prosen, H.** “An Overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins”, **International Journal of Molecular Sciences**, January 2009, 10(1): 62-115

13. Colak, H., Hampikyan, H., Ulusoy B. & Ergun, O. "Comparison of a competitive ELISA with an HPLC method for the determination of aflatoxin M_1 in Turkish White, Kasar and Tulumn cheeses", **European Food Research and Technology**, February 2006, 223(6): 719-723
14. Colak, H. "Determination of Aflatoxin M_1 levels in Turkish White and Kashar Cheeses made of Experimentally Contaminated Raw Milk", **Journal of Food and Drug Analysis**, 2007, 15(2): 163-168
15. Creppy, E.E. "Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe ", **Toxicology Letters**, February 2002, 127(1-3): 19-28
16. Crowther, J., *The ELISA Guidebook*, HUMANA PRESS Inc., 2001, pp. 9-22
17. Deshpande, S.S., *Handbook of food toxicology (Food Science and Technology)*, Marcel Dekker Inc., 2002
18. Diaz, D.E., Hagler W.M.Jr, Blackwelder, J.T., Eve, J.A., Hopkins, B.A., Anderson, K.L., Jones, F.T. & Whitlow, L.W. "Aflatoxin binders II: reduction of aflatoxin M_1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed", **Mycopathologia**, February 2004, 157(2): 233-241
19. Diaz, D., *The Mycotoxin Blue Book*, University Press, 2005, pp. 160, 161, 296, 297
20. Doyle, M.P., Beuchat L.R. & Montville, T.J., *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, ASM Press Washington D.C., 1997, pp. 393-398
21. Dragacci, S., Gleizes, E., Fremi, J.M. & Candlish, A.A.G. "Use of immunoaffinity chromatography as a purification step for the determination of aflatoxin M_1 in cheeses", **Food Additives & Contaminants**, January-February 1995, 12(1): 59-65
22. Eaton, D.L. & Groopman, J.D., *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance*, Academic Press, 1994, pp. 45-72
23. Ertas, N., Gonulalan, Z., Yildirim, Y. & Karadal, F. "A survey of concentration of aflatoxin M_1 in dairy products marketed in Turkey", **Food Control**, December 2011, 22(12): 1956-1959
24. Fallah, A.A., Rahnama, M., Jafari, T. & Saei-Dehkordi, S.S. "Seasonal variation of aflatoxin M_1 contamination in industrial and traditional Iranian dairy products", **Food Control**, October 2011, 22(10): 1653-1656
25. Fink-Gremmels, J. "Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review", **Food Additives and Contaminants: Part A**, February 2008, 25(2): 172-180
26. Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., M Cogan, T. & Guinee, P.T., *CHEESE Chemistry, Physics and Microbiology 3rd Edition Volume I*, ELSEVIER ACADEMIC PRESS, 2004, pp. 561-572
27. Gilbert, J. & Şenyuva, H.Z., *BIOACTIVE COMPOUNDS IN FOODS*, Blackwell Publishing Ltd., 2008, p. 160

28. Goryacheva, I.Yu., Rusanova, T.Yu., Burmistrova, N.A. & De Saeger, S. "Immunochemical Methods for the Determination of Mycotoxins", **Journal of Analytical Chemistry**, August 2009, 64(8): 768-785
29. Grant, D.W. & Carlson, F.W. "Partitioning behavior of aflatoxin M_1 in dairy products", **Bulletin of the Environmental Contamination and Toxicology**, 1971, 6: 521-524
30. Guan, D., Peiwu, L., Cui, Y., Zhang, Q. & Zhang, W. "A competitive immunoassay with a surrogate calibrator curve for aflatoxin M_1 in milk", **Analytica Chimica Acta**, 2011, 703: 64-69
31. Gupta, R.C., *VETERINARY TOXICOLOGY: BASIC AND CLINICAL PRINCIPLES*, Elsevier Inc., 2007, pp. 939-947
32. Haenlein, G.F.W. "Goat milk in human nutrition", **Small Ruminant Research**, 2004, 51: 155-163
33. Hendrickse, R.G., Coulter, J.B.S. & Lamplugh, S.M. "Aflatoxin and Kwashiorkor: A study in Sudanese children", **British Medical Journal**, September 1982, 285(6345): 843-846
34. Hui, Y.H., Smith, R.A. & Spoerke, D.G., *Foodborne Disease Handbook 2nd edition Revised and Expanded*, Marcel Dekker Inc., 2001, pp. 472-474
35. IARC "IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins", **IARC Press**, Volume 56, 1993
36. IARC "IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Napthalene and Styrene" **IARC Press**, Volume 82, 2002, pp.178-300
37. Izquierdo, A.C., Mendoza, R.M, Betancourt, S.P., Gutiérrez, J.F.P. & Oaxaca, J.A.S. "IDENTIFICATION OF M_1 AFLATOXIN IN MILK", **ISAH**, 2005, 2: 380-382
38. Jay, M.J., *MODERN FOOD MICROBIOLOGY 5th edition*, CHAPMAN & HALL, 1996, pp. 595-596
39. Jensen, G.R., *Handbook of Milk Composition*, Academic Press Inc., 1995, pp. 896-897
40. Kamkar, A. "Detection of Aflatoxin M_1 in UHT milk samples by ELISA", **Journal of Veterinary Research**, 2008, 63(2): 7-12
41. Kaniou-Grigoriadou, I., Eleftheriadou, A., Mouratidou, T. & Katikou, P. "Determination of aflatoxin M_1 in ewe's milk samples and the produced curd and Feta cheese", **Food Control**, March 2005, 16(3): 257-261
42. Kumagai, S. "Intestinal absorption and excretion of aflatoxin in rats", **Toxicology and Applied Pharmacology**, January 1989, 97(1): 88-97

43. **Labbé, R.G. & García, S.**, *GUIDE TO FOODBORNE PATHOGENS*, John Wiley and Sons Inc., 2001, pp. 41-45
44. **Martins, M.L., & Martins, H.M.** “Aflatoxin M_1 in raw and ultra high temperature – treated milk commercialized in Portugal”, **Food Additives and Contaminants**, October 2000, 17(10): 871-874
45. **Montagna, M.T., Napoli, C., De Giglio, O., Iatta, R. & Barbuti, G.** “Occurrence of Aflatoxin M_1 in Dairy Products in Southern Italy”, **International Journal of Molecular Sciences**, December 2008, 9(12): 2614-2621
46. **Movassagh, M.H.** “Aflatoxin M_1 contamination in the marketed cow’s raw milk of Tabriz, Iran”, **Annals of Biological Research**, 2011, 2(3): 292-296
47. **Newell, J.** “Treatment for Starvation may kill”, **New Scientist Magazine**, 1983, p. 471
48. **Nielsen, S.S.**, *Food Analysis 2nd Edition*, Aspen Publishers Inc., 1998, pp. 317-318
49. **Osweiler, G.D.**, *Toxicology*, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING, 1996, pp. 417-418
50. **Osweiler, G.**, *AFLATOXINS and ANIMAL HEALTH*, Iowa State University, 2005, pp. 1-4
51. **Pandya, A.J. & Ghodke, K.M.** “Goat and sheep milk products other than cheeses and yoghurt”, **Small Ruminant Research**, March 2007, 68(1): 193-206
52. **Payne, G.A. & Brown, M. P.** “GENETICS AND PHYSIOLOGY OF AFLATOXIN BIOSYNTHESIS”, **Annual Reviews**, 1998, 36: 329-362
53. **Piva, G., Galvano, F., Pietri, A., & Piva, A.** “Detoxification methods of aflatoxins: a review”, **Nutrition Research**, May 1995, 15(5): 689-715
54. **Polan, C.E., Hayes, J.R. & Campbell, T.C.** “Consumption and fate of aflatoxin B_1 by lactating cows”, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, July 1974, 22(4): 635-638
55. **Posati, L.P. & Orr, M.L.**, *Composition of Foods, Dairy and Egg Products*, Agriculture Handbook No. 8-1. USDA-ARS, Consumer and Food Economics Institute Publishers, 1976, pp. 77–109.
56. **Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M. & Piva, G.** “On the occurrence of aflatoxin M_1 in milk and dairy products”, **Food and Chemical Toxicology**, May 2009, 47(5): 984-991
57. **Rahimi, E.** “A Study on Contamination of Aflatoxin M_1 in Milk and Infant Milk Products in Iran”, **American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences**, 2010, 2(2): 109-111
58. **Rao, N.S.B. & Chopra, R.C.** “Influence of sodium bentonite and activated charcoal on aflatoxin M_1 excretion in milk of goats”, **Small Ruminant Research**, September 2001, 41(3): 203-213

59. **Roberts, T.A., Baird-Parker, A.C. & Tompkin, R.B.**, *Microorganisms in Foods/ Characteristics of Microbial Pathogens (ICMSF)*, Edmundsbury Press Ltd., 1996, pp. 347-367
60. **Rosi, P., Borsari, A., Lasi, G., Lodi, S., Galanti, A., Fava, A., Girotti & S., Ferri, E.** “Aflatoxin M_1 in milk: Reliability of the immunoenzymatic assay”, **International Dairy Journal**, May 2007, 17(5): 429-435
61. **Roussi, V., Govaris, A., Varagouli & A., Botsoglou, N.** “Occurrence of aflatoxin M_1 in raw and market milk commercialized in Greece”, **Food Additives and Contaminants**, September 2002, 19(9): 863-868
62. **Rubio, R., Berruga, M.I., Román, M. & Molina, A.** “Evaluation of immunoenzymatic methods for the detection of aflatoxin M_1 in ewe’s milk”, **Food Control**, November 2009, 20(11): 1049-1052
63. **Ruiquian, L., Qian, Y., Thanaboripat, D. & Thansukon, P.** “*BIOCONTROL OF Aspergillus flavus AND AFLATOXIN PRODUCTION*”, **Science and Technology Journal**, January 2005, 4(1): 1-9
64. **Smith, J.E. & Anderson, R.A.**, *Mycotoxins and Animal Foods*, CRC Press, 1991, pp.37-56
65. **Tabata, S.** “Aflatoxins and Related Compounds”, **Encyclopedia of Dairy Sciences**, 2004, pp. 2087-2095
66. **Tajik, H., Rohani, S.M. & Moradi, M.** “Detection of aflatoxin M_1 in raw and commercial pasteurized milk in Urmia, Iran”, **Pakistan Journal of Biological Sciences** November 2007, 10(22): 4103-4107
67. **Troller, A.J.**, *Sanitation in Food Processing*, Academic Press Inc., 1993, pp.115-117
68. **Veldman, V.A., Mejis, J.A.C., Borggreve, G.J. & Heeres van der Tol, J.J.** “Carry-over of aflatoxin from cows’ food to milk”, **Animal Production**, March 1992, 55(2): 163-168
69. **Wang, J.S., Shen, X., He, X., Zhu, Y.R., Zhang, B.C., Wang, J.B., Qian, G.S., Kuang, S.Y., Zarba, A., Egner, P.A., Jacobson, L.P., Muñoz, A., Helzlsouer, K.J., Groopman, J.D. & Kensler, T.W.** “Protective Alterations in Phase 1 and 2 Metabolism of Aflatoxin B_1 by Oltipraz in Residents of Qidong, People’s Republic of China”, **JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE**, February 1999, 91(4): 347-354
70. **Wang, H. , Zhou, X. J. , Liu, Y. Q. , Yang, H. M. & Guo, Q. L.** “Determination of aflatoxin M_1 in milk by triple quadrupole liquid chromatography-tandem mass spectrometry”, **Food Additives & Contaminants**, September 2010, 27 (9): 1261-1265
71. **Weidenbörner, M.**, *Encyclopedia of Food Mycotoxins*, Springer-Verlag, 2001, pp.1-16

72. **WHO & U.S. C.D.C.**, *Public Health Strategies for Preventing Aflatoxin Exposure*, 2005, p. 6
73. **Yousef, A. & Carlstrom, C.**, *Food Microbiology: A Laboratory Manual*, John Wiley & Sons, Inc., 2003, p. 43
74. **Zheng, M. Z., Richard, J.L. & Binder J.** “A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins”, **MYCOPATHOLOGIA**, May 2006, 161(5): 261-273

Ελληνική

1. **Βάσσος, Δ.Β.**, *ΤΡΟΦΙΜΑ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΤΑΝΑΛΩΤΗ (Τροφογενείς διαταραχές)*, Εκδόσεις Παπασωτηρίου, 2004, σελ. 131-136
2. **Γεωργαλά, Α., Καραλή Φ., Μοάτσου Γκ. και Καμιναρίδης Στ.** “*Η παρουσία της αφλατοξίνης M₁ στα τυριά*”, **Εθνική Επιτροπή Γάλακτος Ελλάδας (Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών)**, 2009, 1: 26-41
3. **Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 165/2010** της ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 26^{ης} Φεβρουαρίου 2010 για την τροποποίηση του Κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 για τον «καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα αναφορικά με τις αφλατοξίνες».

Διαδικτυακές παραπομπές

1. www.fermentek.co.il/cyclopiazonic_acid.htm
2. www.fao.org

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

S: 36/37-80-81

1. Identification of the substance/preparation and of the Company/Undertaking

1.1 Product name

Aflatoxin M1 Standards

1.2 Application of the substance/the preparation:

In vitro diagnostic reagent

1.3 Company/Undertaking identification

Tecna S.r.l.

c/o Area Science Park, Padriciano 99

34012 TRIESTE

tel. +39 040 3755341

fax +39 040 3755343

1.4 Emergency telephone

Please, contact your local Poison Centre (internet address <http://www.hbi.ir/hosting/dpic/item/intlist.htm>, http://www.zionshope.com/poison_control/international/index.htm)

UK: National Poisons Information Service, London, UK, +44 20 7955 5095

Italy: Centro Antiveleni Niguarda Cà Granda, 20100 Milano, +39 02 68101029

China: Center for Acute Poisoning Control, Institute of Occupational Medicine, Chinese Academy of Preventive Medicine, 29 Nanwei Road, Beijing 100050, +86 10 63175468, e-mail: pcc@ccs.capm.ac.cn

2. Composition/information on ingredients

Known hazardous components (for the wording of the listed R and S risk phrases refer to section 16):

Substance	MF	% (wt/wt)	Symbol/R-phrases	CAS No.	CE	Annex I
Aflatoxin M1	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	<0.0001	Xn R: 40-48 S: 36/37	846-48-0	212-686-0	-----
Preservative	-----	<0.1	1+; N R: 28-32-50/53 S: (1/2-) 28-45-60-61	-----	-----	-----

3. Hazards identification

Classification: Aflatoxin M1 Standards is classified as non-hazardous. The hazardous chemicals contained in the product (wt/wt, preservative, <0.1%, aflatoxin M1, max 100 ng/L) are within the limits permitted under current European legislation.

This product contains a preservative that forms explosive compounds by reacting with heavy metals present in laboratory equipment and plumbing. Risks are significantly reduced in dilute solutions of preservative.

This product contains traces of aflatoxin M1, classified as a category 3 carcinogen.

Notwithstanding the low concentrations of single components, handle with extreme care, avoiding repeated and prolonged exposure.

Potential health effects:

Use this product according to the instruction manual.

Aflatoxin M1, in pure powder form, is classified as a category 3 carcinogen, tied to the appearance of teratogenic effects in laboratory animals (rat). It is harmful if swallowed. Its target organs are the reproductive system. It may be hazardous for health in case of prolonged exposure.

Preservative, in pure powder form, is very toxic if swallowed, inhaled and by skin contact. It has high acute toxicity. Target organs are the brain and central nervous system.

Potential environmental effects:

This product is not classified as hazardous for the environment.

4. First-aid measures

After ingestion: give plenty of water and rinse mouth repeatedly. Do not administer anything if victim is unconscious. Get medical aid immediately.

Rev.: 0	Last version update	02-12-2004	Page 1 of 5
---------	---------------------	------------	-------------

std MA 410/M19



11-35
Tel: +39 040 3755341
E-mail: info@tecna-biotech.com

1. Identification of the substance/preparation and of the Company/Undertaking

1.1 Product name

Stop Solution

1.2 Use of the substance/preparation

In vitro diagnostic reagent.

1.3 Company/Undertaking identification

Tecna S.r.l.
c/o Area Science Park, Padriciano 88
34012 TRIESTE (Italy)
phone +39 040 3755341
fax +39 040 3755343

1.4 Emergency telephone

Please, contact your local Poison Centre (internet address <http://www.hbi.it/hosting/dpic/item/intlist.htm>,
http://www.zionshope.com/poison_control/international/index.htm)

UK: National Poisons Information Service, London, UK, +44 20 7955 5095

Italy: Centro Antiveleni Niguarda Cà Granda, 20100 Milano, +39 02 88101029

China: Center for Acute Poisoning Control, Institute of Occupational Medicine, Chinese Academy of Preventive Medicine, 29 Nanwei Road, Beijing 100050, +86 10 83175468, e-mail: pcc@ccs.cacpm.ac.cn

2. Composition/information on ingredients

Known hazardous substances (see section 16 for risk and safety phrases full text):

Substance	MF	% (w/w)	Health Class	CAS No.	ELINCS EINECS	N. CEE
Sulphuric acid...%	H ₂ SO ₄	≥15	C R 35 S (1/2)-26-30-45	7804-93-9	231-839-5	018-020-00-8

3. Hazards Identification

Classification: stop solution is classified as **corrosive** hazardous preparation.

Target organs: respiratory system, eyes, skin, teeth, lungs

Routes of exposure: can affect the body if it is inhaled or if it comes in contact with eyes or skin. It can also affect the body if swallowed.

Potential health effects to human:

Use product according to instruction for use. Packaging and minimum quantity (<10 ml) reduce health risks.

Main exposure effects and symptoms:

Ingestion: causes serious burns of the mouth or perforation of the esophagus or stomach.

Inhalation: corrosive. May be harmful if inhaled. May cause severe irritation and burns of the nose, throat and upper respiratory tract.

Skin contact: incidental splashes on the skin will cause severe skin burns. Charring of the skin is a result of the great affinity for water and strong exothermic reaction with. Direct contact with stop solution can cause irritation, redness, swelling, burns and severe skin damage.

Eyes contact: direct contact with the liquid or exposure to vapours or mists may cause stinging, tearing, redness, swelling, corneal damage and, sometimes, irreversible eyes damage. Incidental splashes in the eyes will cause severe burns. Contact lenses should not be worn when working with high concentration sulphuric acid solution.

Rev: 0	Last version update:	02-12-2004	Page 1 di 6
--------	----------------------	------------	-------------

www.tecna-biotech.com info@tecna-biotech.com

AFLATOXIN M₁ ELISA KIT

Aflatoxin M₁ is a toxic metabolite of aflatoxin B₁. It is normally excreted in the urine and also the milk of dairy cattle and other lactating mammals. Due to the high toxicity of aflatoxin M₁, the European Community established the maximum level of 0.05 µg/kg for aflatoxin M₁ in liquid milk. In case of infant and follow-on milk the limit is 0.025 µg/kg.

By the other side, the Codex Alimentarius Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) has established an acceptable level of risk at 0.5 µg/kg for aflatoxin M₁ in fluid milk.

In the U.S.A. the FDA established an action level of 0.5 µg/kg.

Assay principle

Competitive enzyme immunoassay.

Applications

Raw milk, milk powder.

Standard curve range

5-250 ng/l (Aflatoxin M₁ standards).

Detection limits

0.005 ppb (µg/kg).

Measuring range

Depending on the analysis:

- 0.005 - 0.250 ppb (µg/kg).
- 0.025 - 1.250 ppb (µg/kg)*.
- 0.050 - 2.500 ppb (µg/kg)*.

* See "Material not provided" section.

Specificity (% of cross-reactivity)

Aflatoxina M ₁	100
Aflatoxina M ₂	16

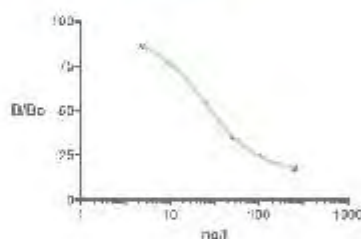
Sample preparation

- Raw milk: refrigeration at +2/+8 °C, centrifugation.
Measuring range 0.005-0.250 ppb: undiluted samples.
Measuring range 0.025-1.250 ppb: sample dilution 1:5.
- Milk powder: dilution, centrifugation.

Assay time

1 h and 15 min. (sample preparation not included).

Example of the calibration curve



Advantages

- Choice of measuring range.
- High accuracy.
- High reproducibility.
- Most of the reagent ready to use.
- Performance data sheet available.
- Free spreadsheet downloadable at www.tecnalab.com to calculate sample concentration.
- Kit compliant with requirements of ISO 14675:2003.

Storage conditions

+2/+8 °C.

Shelf-life

10 months from date of manufacturing.

(REV. 01/06/06)

Tecna S.r.l. c/o Area Science Park • Loc. Padriciano, 99 • 34012 Trieste/Italy
Tel. +39 040 3755341 +39 040 8992256 • Fax +39 040 8992247
techservice@tecnalab.com • www.tecnalab.com

1. Identification of the substance/preparation and of the Company/Undertaking

1.1 Product name

Washing Buffer 20x

1.2 Use of the substance/preparation

In vitro diagnostic reagent.

1.3 Company/Undertaking identification

Tecna S.r.l.
c/o Area Science Park, Padriciano 99
34012 TRIESTE (Italy)
phone +39 040 3755341
fax +39 040 3755343

1.4 Emergency telephone

N.A.

2. Composition/information on ingredients

Known hazardous substances (see section 16 for risk and safety phrases full text): none

Aqueous concentrated solution, containing minerals and a detergent.

3. Hazards Identification

Classification: washing buffer is classified as non-hazardous material to health and to environment, in compliance with the legislation in force concerning the classification, packaging and labelling of dangerous substances and preparations. MSDS is not requested.

Nevertheless, as the washing buffer solution represents a phase of an immuno-enzymatic assay, avoid to disperse this component into the environment and dispose as special waste.

9. Physical and Chemical Properties

Appearance	liquid
Odour	Odourless
Colour	colourless

16. Other information

IMPORTANT! Use the product according to the indicated use and to the instruction.

Every effort has been made to ensure that the above information conforms with the latest available data. However, since data, safety standards and government regulations are subject to change and since the conditions of handling and use (or misuse) are beyond our control, Tecna S.r.l. makes no warranty, either expressed or implied, with respect to the completeness or continuing accuracy of the information contained herein. Tecna S.r.l. disclaims all liability for the use of such information, including any recommendation which user may construe and attempt to apply which may infringe or violate valid patents, licences, and/or copyright. It is user's responsibility to determinate the suitability of this product and to evaluate risks prior to use, and then to exercise appropriate precautions for protection of employees and others.

THIS DOCUMENT IS NOT A SAFETY DATA SHEET

Rev: 0	Last version update	02-12-2004	Page 1 of 1
--------	---------------------	------------	-------------

sol lav 20x MA 440/441 en it

1. Identification of the substance/preparation and of the Company/Undertaking

1.1 Name of the product

Developing Solution

1.2 Use of the substance/preparation

In vitro diagnostic reagent.

1.3 Company/Undertaking identification

Tecna S.r.l.
c/o Area Science Park, Padriciano 99
34012 TRIESTE (Italy)
phone +39 040 3755341
fax +39 040 3755343

1.4 Emergency telephone

N.A.

2. Composition/information on ingredients

Known hazardous substances (see section 16 for risk and safety phrases full text):

Substance	MF	% (wt/wt)	Health class	CAS	CE	Annex I
3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride	C ₁₉ H ₁₆ N ₂	<0,2	Xn R: 20/21/22-40 S: 22-36	64285-73-0	254-769-6	-----

3. Hazards Identification

Classification: developing solution is classified as non-hazardous material to health and to environment in compliance with the legislation in force concerning the classification, packaging and labelling of dangerous substances and preparations. MSDS is not requested.

Nevertheless, as the developing solution represents a phase of an immuno-enzymatic assay, avoid to disperse this component into the environment and dispose as special waste.

9. Physical and Chemical Properties

Appearance	Liquid
Odour	Odourless
Colour	colourless

16. Other information

Risk and safety phrases full text

R phrases

R 20/21/22: harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed
R 40: Limited evidence of a carcinogenic effect.

S phrases

S 22: Do not breathe dust.
S 36: Wear suitable protective clothing.

IMPORTANT! Use the product according to the indicated use and to the instruction.

Every effort has been made to ensure that the above information conforms with the latest available data. However, since data, safety standards and government regulations are subject to change and since the conditions of handling and use (or misuse) are beyond our control, Tecna S.r.l. makes no warranty, either expressed or implied, with respect to the completeness or continuing accuracy of the information contained herein. Tecna S.r.l. disclaims all liability for the use of such information, including any recommendation which user may construe and attempt to apply which may infringe or violate valid patents, licences, and/or copyright. It is user's responsibility to determinate the suitability of this product and to evaluate risks prior to use, and then to exercise appropriate precautions for protection of employees and others.

THIS DOCUMENT IS NOT A SAFETY DATA SHEET

Rev: 0	Last version update	02-12-2004	Page 1 of 1
--------	---------------------	------------	-------------

sol swi N MA 440/441 en it

1. Identification of the substance/preparation and of the Company/Undertaking

1.1 Product Name

Enzyme Conjugate Diluent

1.2 Use of the substance/preparation

In vitro diagnostic reagent.

1.3 Company/Undertaking identification

Tecna S.r.l.
c/o Area Science Park, Padriciano 99
34012 TRIESTE (Italy)
phone +39 040 3755341
fax +39 040 3755343

1.4 Emergency telephone

N.A.

2. Composition/information on ingredients

Known hazardous substances (see section 16 for risk and safety phrases full text):

Concentrated aqueous solution Soluzione, containing salts.

3. Hazards Identification

Classification: enzyme conjugate diluent is classified as non-hazardous material to health and to environment in compliance with the legislation in force concerning the classification, packaging and labelling of dangerous substances and preparations. MSDS is not requested.

Nevertheless, as the washing buffer solution represents a phase of an immuno-enzymatic assay, avoid to disperse this component into the environment and dispose as special waste

9. Physical and Chemical Properties

Appearance	liquid
Odour	Odourless
Colour	colourless

16. Other information

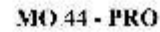
IMPORTANT! Use the product according to the indicated use and to the instruction.

Every effort has been made to ensure that the above information conforms with the latest available data. However, since data, safety standards and government regulations are subject to change and since the conditions of handling and use (or misuse) are beyond our control, Tecna S.r.l. makes no warranty, either expressed or implied, with respect to the completeness or continuing accuracy of the information contained herein. Tecna S.r.l. disclaims all liability for the use of such information, including any recommendation which user may construe and attempt to apply which may infringe or violate valid patents, licences, and/or copyright. It is user's responsibility to determinate the suitability of this product and to evaluate risks prior to use, and then to exercise appropriate precautions for protection of employees and others.

THIS DOCUMENT IS NOT A SAFETY DATA SHEET

Rev: 0	Last version update	02-12-2004	Page 1 of 1
--------	---------------------	------------	-------------

dl conj MA 440/441 en it



REVISIONE N° 2

1. Identification of the substance/preparation and of the Company/Undertaking

1.1 Product name

Enzyme Conjugate

1.2 Use of the substance/preparation

In vitro diagnostic reagent.

1.3 Company/Undertaking identification

Tecna S.r.l.
c/o Area Science Park, Padriciano 89
34012 TRIESTE (Italy)
phone +39 040 3755341
fax +39 040 3755343

1.4 Emergency telephone

Please, contact your local Poison Centre (internet address <http://www.hbl.in/hosting/dpicitem/inlist.htm>, http://www.zionshope.com/poison_control/international/index.htm)

UK: National Poisons Information Service, London, UK, +44 20 7955 5095

Italy: Centro Antiveleni Niguarda Cà Granda, 20100 Milano, +39 02 86101029

China: Center for Acute Poisoning Control, Institute of Occupational Medicine, Chinese Academy of Preventive Medicine, 29 Nanwei Road, Beijing 100050, +86 10 83175468, e-mail: ccc@ccs.cadm.ac.cn



R 20/21/22
S 36/37/39-45-60-51

2. Composition/information on ingredients

Known hazardous components (for the wording of the listed R and S risk phrases refer to section 16): hazardous substances, covered by intellectual property, classified as harmful by inhalation, by skin contact and by ingestion (R 20/21/22), at a concentration equal or greater than those defined in the following table unless lower values are given in Annex I to Directive 67/548/EEC, or in Part B of Annex II to this Directive or in Part B of Annex III thereto, unless otherwise specified in Annex V to this Directive.

There are other hazardous substances, covered by intellectual property too, classified as irritating to eyes, respiratory system and eyes (R 36/37/38), at a concentration upper to 1% (wt/wt) but lower to the established limits.

3. Hazards Identification

Classification: the enzyme conjugate is classified as a dangerous preparation, harmful by inhalation, if swallowed and in contact with skin.

Target organs: skin, eyes, stomach.

Route of exposure:

Routes of exposure: inhalation, contact/absorption through skin, contact with eyes, and ingestion.

Potential health effects:

Use this product according to the instruction manual.

Main risks from exposure and exposure symptoms:

Inhalation: irritating to mucous membranes of the upper respiratory tract.

Ingestion: harmful.

Contact with skin: irritating. May be adsorbed by skin. It is not a sensitizing or corrosive preparation.

Contact with eyes: irritating. Symptoms include burning sensation, tearing, redness or irritation.

Chronic exposure: preparation is classified as non-carcinogen by NIOSH. No other available data.

Previous conditions aggravated by further exposure: not known.

Potential environmental effects:

This product is not classified as hazardous for the environment.

Rev: 0	Last version update	02-12-2004	Page 1 of 4
--------	---------------------	------------	-------------

cod MA 44(M44) rev01

1. Identification of the substance/preparation and of the Company/Undertaking

1.1 Product name

Microtiter plate

1.2 Use of the substance/preparation

In vitro diagnostic reagent.

1.3 Company/Undertaking identification

Tecna S.r.l.
c/o Area Science Park, Padriciano 99
34012 TRIESTE (Italy)
phone +39 040 3755341
fax +39 040 3755343

1.4 Emergency telephone

N.A.

2. Composition/information on ingredients

Known hazardous substances (see section 16 for risk and safety phrases full text):

Polystyrene plastic material, packaged into a multilayer plastic envelope, coupled with aluminium, with desiccant (amorphous silica).

3. Hazards Identification

Classification: microtiter plate is classified as non-hazardous material to health and to environment in compliance with the legislation in force concerning the classification, packaging and labelling of dangerous substances and preparations. MSDS is not requested.

Nevertheless, as the microtiter plate is built with plastic material and as it represents a phase of an immuno-enzymatic assay, avoid to disperse this component into the environment and dispose as special waste.

9. Physical and Chemical Properties

Appearance	polystyrene plastic material, 96-wells breakable (or 48-wells) microtiter plate (12 strips each of 8 wells, assembled with a plastic frame).
Odour	odourless
Colour	Wells: transparent; frame: white

16. Other information

IMPORTANT! Use the product according to the indicated use and to the instruction.

Every effort has been made to ensure that the above information conforms with the latest available data. However, since data, safety standards and government regulations are subject to change and since the conditions of handling and use (or misuse) are beyond our control, Tecna S.r.l. makes no warranty, either expressed or implied, with respect to the completeness or continuing accuracy of the information contained herein. Tecna S.r.l. disclaims all liability for the use of such information, including any recommendation which user may construe and attempt to apply which may infringe or violate valid patents, licences, and/or copyright. It is user's responsibility to determinate the suitability of this product and to evaluate risks prior to use, and then to exercise appropriate precautions for protection of employees and others.

THIS DOCUMENT IS NOT A SAFETY DATA SHEET

Rev: 0	Last version update	02-12-2004	Page 1 of 1
--------	---------------------	------------	-------------

micr MA 440/441 en 10

RIDASCREEN[®] Aflatoxin M₁ 30/15

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von
Aflatoxin M₁

Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of
aflatoxin M₁

Art. No.: R1111

In vitro Test
Lagerung bei 2 - 8 °C
Storage at 2 - 8 °C

R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany
Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20

Einweisung für die Benutzung ohne Software:

Extinction Standard (conc. Protein) $\times 100 = \% \text{ Extinction}$
Extinction Nullstandard

Das Malteser® enthält gleich 100 % Seiten und die Extinktionswerte in Protein angegeben. Die angegebenen Werte für die Standards in einem Koordinatensystem auf logarithmischer Skala. Mikrotiterplatten zeigen die Malteser M-Konzentrationen (log) an.

Um die in den Proben enthaltenen Malteser M-Konzentrationen in % zu erhalten, muss die aus der Extinktion erhaltene Konzentration mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Beim Ablesen nach der angegebenen Vorschrift sollen folgende Verdünnungsverhältnisse

Mikro	1
Mikro (bevorzugt auf reduzierte Milch)	1
Mikro (bevorzugt auf Protein)	10
Mikro	10

Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen nur einen groben Überblick und einen Anhaltspunkt geben. Die Angaben sind nicht die definitive, bestimmte Eigenschaften der Produkte, die durch die Angabe für einen konkreten Einsatzbereich zu einem Produkt überträgt werden. Die Angaben sind nur für die Standardisierung der Produkte, die in den Produkten enthalten sind, und nicht für die anderen Produkte, die in den Produkten enthalten sind. Die Angaben sind nur für die Standardisierung der Produkte, die in den Produkten enthalten sind, und nicht für die anderen Produkte, die in den Produkten enthalten sind.

RIDASCREEN® MALTESER M 30/15

RIDASCREEN® Aflatoxin M₁ 30/15

Brief Information

RIDASCREEN® Malteser M₁ 30/15 (Afl. M₁ R1111) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of aflatoxin M₁ in milk, milk powder and cream.

All reagents required for the enzyme immunoassay - including standards - are contained in the test kit.

The test kit is sufficient to test 30 samples in a 96-well microtiter plate. A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation:
milk: deproteinized
milk powder: reconstituted and degreased
cream: extraction and centrifugation

Time requirement:
sample preparation for 10 samples: approx. 3.5 h
milk and milk powder: approx. 2 h
cream: approx. 1 h

Detection limit:
milk: 5 ppb
milk powder: reconstituted milk: 5 ppb
milk powder: reconstituted milk: 50 ppb
cream: 50 ppb

Recovery rate:
in spiked fatty milk (10 - 80 ppb): approx. 95 %
coefficient of variation: approx. 14 %
milk powder: approx. 95 %
cream: approx. 102 %
coefficient of variation: approx. 11 %

Specificity:
The specificity of the RIDASCREEN® Malteser M₁ 30/15 was established by analyzing the cross-reactivity to corresponding mycotoxins.

Aflatoxin M ₁	100 %
Aflatoxin B ₁	30 %

RIDASCREEN® MALTESER M₁ 30/15

11

1. Intended use

HIKING-20™ ATLASIN M-20™ is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of aflatoxin M₁ in milk, milk powder and dressings.

2. General

Aflatoxin is a carcinogenic, highly toxic molecule of the mold fungus *Aspergillus* genus and *Aspergillus* species. Aflatoxin M₁ is produced as a metabolite of aflatoxin B₁. It is secreted with milk after feeding of aflatoxin B₁ containing feed to lactating cows. As aflatoxin M₁ is relatively stable towards the pasteurizing process, not only a comprehensive analysis, but also a check of the raw materials to be processed is required, but also of the final products.

Since the first of January 1986 EU-wide uniform maximum limits for aflatoxins exist. For aflatoxin M₁, this limit has been fixed at 0.05 µg/l (50 ppt).

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The wells of the microtiter strips are coated with specific antibodies against aflatoxin M₁. Aflatoxin M₁ standards or the sample solutions are added. After washing away the enzyme conjugate, free aflatoxin M₁ and aflatoxin M₁ enzyme conjugate compete for the aflatoxin M₁ antibody binding sites (forming the enzyme immunoassay). Any unbound enzyme conjugate is then removed in a washing step.

Substrate chromogen is added to the wells and incubated. Bound enzyme conjugate converts the chromogen into a blue product. The addition of the stop solution leads to a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm, and the absorption is inversely proportional to the aflatoxin M₁ concentration in the sample.

42

HIKING-20™ ATLASIN M-20™ 05-00-07

4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for 96 measurements (including standard samples). Each test kit contains:

- 7 × Microtiter plate with 96 wells (12 strips with 8 wells each), color coded with or without against aflatoxin M₁
- 8 × Aflatoxin M₁ standard solution (1.3 ml each), 0 µl (zero standard), 5 µl, 10 µl, 20 µl, 40 µl, 80 µl aflatoxin M₁ in milk buffer
- 1 × Conjugate (1.3 ml) 100 cpo
- 1 × Substrate chromogen (1.0 ml) 100 cpo
- 1 × Stop solution (14 µl) brown cpo
- 1 × Buffer 1 (14 µl) yellow cpo
- 1 × Buffer 2 (20 ml) white cpo
- 1 × Buffer 3 (12 µl) white cpo
- 1 × Washing buffer (18 µl) white cpo
- 1 × Washing buffer (18 µl) for preparation of a 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) contains 0.05 % Tween 20

5. Materials required but not provided

5.1. Equipment:

- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- conjugate
- pasteurizer
- graduated pipettes
- variable 20 µl, 100 µl and 200, 1000 µl micropipettes
- 10 × 100 × 20 mm plates
- plates
- incubator

HIKING-20™ ATLASIN M-20™ 05-00-07

19

5.2 Reagents

—For standard samples only

—methanol

—n-butanol

—nitroform/nitromethane

—PES-buffer, pH 7.2: 0.55 g Na₂HPO₄ × 11H₂O + 2.05 g NaH₂PO₄ × 2H₂O + 8 g NaCl fill up to 1000 ml with distilled water

6. Warnings and precautions for the users

The standard solutions contain alkaline M₁ particles for users should be taken. Avoid contact of the reagent with the skin (see gloves).

Determination of the phosphoric acid content in the solutions is best carried out using a solution typed in the (bleach) solution (10% w/v) overnight. Adjust solution with HCl to pH 7.

The stock solution contains 1 N solution and (0.28/0.38, 0.2/0.26)

7. Storage instructions

Store in dark at 2 - 8 °C (20 - 40 °F). Do not freeze any test kit components

Return any unused reagents to their original full seal, vessel them together with the desiccant provided and further store at 2 - 8 °C (35 - 40 °F).

A sensitive light-sensitive, therefore, avoid exposure to direct light.

The substrate/chromogen solution is light sensitive, therefore, avoid exposure to direct light.

No quality guarantee is accepted after the expiration date on the kit label.

Do not interchange individual reagents between kits of different lot numbers.

8. Indication of instability or deterioration of reagents

—any bluish coloration of the red stained substrate/chromogen solution prior to test (explanation see below)

—a value of less than 0.6 absorbance units (A_{630 nm} × 0.5) for the zero value (blank)

14

REINSCREVEN, Afdeling M₁, D.V.10, GRIJPS-DE

9. Preparation of Samples

The samples should be stored in a cool place, protected against light.

9.1. Milk

—centrifuge milk samples for separating: 10 min / 2500 g / 10 °C (50 °F)

—if a not needed centrifuge is not suitable, chill sample to 4 °C (39 °F) prior to centrifugation

—after centrifugation, remove upper cream layer completely by aspirating through a pipette or pipette

—use the skimmed milk (= obtained supernatant) directly in the test (100 µl per well)

9.2. Milk powder

weigh 10 g milk powder in a flask and fill up to 100 ml with deionised water dissolved by stirring for 5 min

continue with the preparation of milk as described in 8.1.

9.3. Cheese

A representative sample is filled (carefully and thoroughly mixed, without the addition of liquid).

In the case of cheese varieties with a water content, the surface may not be used, as this leads to interferences with the test system.

weigh 2 g of the cheese cheese into a centrifugal glass vial

add 40 ml dimethylformamide and extract by shaking for 15 min

After the extraction, evaporate 10 µl of the extract at 60 °C (143 °F) under a weak N₂ stream

redissolve the dry residue in 0.5 ml methanol, 0.5 ml PBS buffer (see 5.2.1 and 1 ml hexane, mix thoroughly,

centrifuge: 10 min / 2700 g / 15 °C (59 °F)

remove the upper hexane-lower completely

pour off an aliquot of the lower methanol-extract, if seen carefully using a

pipette pipette

dilute 100 µl of this aliquot with 400 µl 0.5% (v/v) 1 (1:5 dilution) and use 100 µl per

well in the test

Remark:

If a further dilution is required, use buffer 1 (see 4.) for the dilution.

15

REINSCREVEN, Afdeling M₁, D.V.10, GRIJPS-DE

10. Test Implementation

10.1. Preliminary comments

Bring all reagents to room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) before use.

The alkaline M₁ enzyme conjugate bottle with no seal is provided as a convenience. Since the alkaline enzyme conjugate solution has a limited stability, only the amount which is needed should be used. After placing the conjugate concentrate should be shaken carefully. For convenience, the conjugate concentrate is filled 1.1 (110%) in buffer 2 bottle with water (50 - 60 - 60) µl conjugate concentrate + 4 - 4 µl buffer, sufficient for 4 microtiter or 1 µl.

As washing buffer a PBS-Tween buffer is needed. Please use the washing buffer (see 4.1) contained in the kit. Dissolve the entire buffer salt in one liter of distilled water. The newly to use washing buffer contains after mixing 4 - 5 weeks at 2 - 8 °C (32 - 46 °F).

Alkaline M₁: Dissolve the contents of the jar in 120 ml of distilled water to obtain a 1000 concentration. In the 120 ml of distilled water to obtain concentration and dissolve with 8 µl of distilled water to obtain 100 ready to use washing buffer.

This solution remains stable for 8 - 12 weeks, store at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

10.2. Test procedure

Carefully follow the recommended washing procedure. The protocol for microtiter to use is as follows:

1. Insert a sufficient number of microtiter wells into the microtiter holder for all standards and samples to be run in duplicate. Remove standard and sample positions.
2. Add 100 µl of the standard solutions or colored sample to separate positions wells. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 20 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
3. Pour the liquid out of the wells and set the microtiter holder upside down vigorously press times in a new enzyme standard plate to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl washing buffer (see 4.1) and pour out the liquid again. Repeat the washing procedure two times.

46

30/03/2018 10:41:00 AM N. 2018 05/20/17

5. Add 100 µl of the diluted enzyme conjugate. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 20 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.

6. Pour the liquid out of the wells and tap the microtiter holder upside down vigorously press times in a new enzyme standard plate to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl washing buffer (see 4.1) and pour out the liquid again. Repeat the washing procedure two times.

7. Add 100 µl of substrate (brown) (lower test to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 15 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.

8. Add 100 µl of stop solution (yellow) to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm against an alkaline Read within 15 minutes after addition of stop solution.

11. Results

A special software, the RIDA-SOFT (Win 95, No. 200001), is available for read solution of the RIDA-SOFT or other microtiter.

The output of the standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate enclosed in the kit.

See also for the calculation within software.

absorbance standard for 84 samples
absorbance for standard

absorbance for standard

RIDA-SOFT 4.0.0.0 (Win 95) 05/20/17

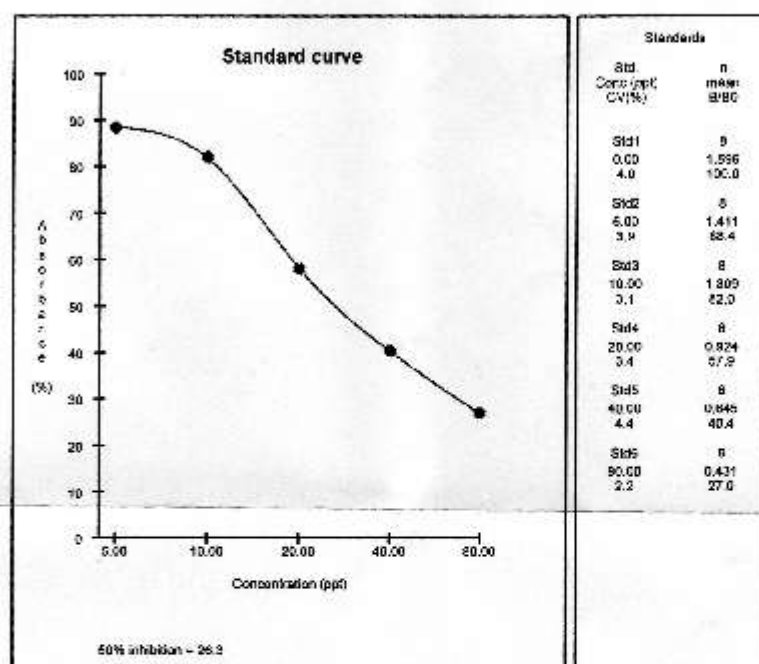
17

QUALITY ASSURANCE CERTIFICATE

RIDASCREEN® Aflatoxin M1 30/15

Art. No.: R1111 Lot: 13400 Expiry: 2011-10

R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany certifies that this batch has been approved by the Quality Assurance Department and conforms with specifications



	Lot No.	Expiry
Microwell plate	16360	2012-02
Standards	11330	2011-10
Conjugate	12400	2011-12
Buffer1	02488	2011-10
Buffer2	03489	2011-11
Read Chromogen Pro	13090	2012-07
Stop solution	02449	2014-09
Washing buffer sol.	039K8210	2014-08

Please note:

The absorbance for the standards may decrease during the shelf life of the kit. The general shape of the curve will remain similar, while the slope might change slightly. Furthermore refer to product leaflet 8. Indication of instability or deterioration of reagents.

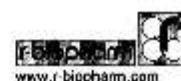
sign.: Edda Rohm
Quality Assurance Representative

Date: 2010-10-06

Remark:

This document has been created electronically and is therefore valid without a signature.

The R-Biopharm group is DIN EN ISO 9001 certified.



AFLATOXIN M1 EIA – Euro-Diagnostica B.V.

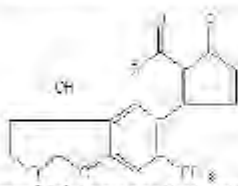
Κωδικός παραγγελίας: 5121AFM1p

ΓΕΝΙΚΕΣ ΣΥΝΟΠΤΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Το τεστ Αflatoxίνη M1 EIA είναι μία ανταγωνιστική ενζυμική ανοσοανάλυση για την ανίχνευση δειγμάτων γάλατος και γαλακτοκομικών προϊόντων όσον αφορά την συγκεκριμένη μυκοτοξίνη.

Το τεστ είναι βασισμένο σε αντιβιώματα έναντι της Αflatoξίνης M1. Με το Αflatoxίνη M1 EIA kit 96 αναλύσεις μπορούν να λάβουν μέρος. Προτείνεται δείγματα και πρότυπα να μετρούνται εις διπλούν άρα συνολικά μπορούν να αναλυθούν 40 δείγματα. Το Αflatoxίνη M1 EIA kit περιέχει όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια, συμπεριλαμβανόμενου προτύπων, που απαιτούνται για την εκτέλεση του τεστ. Υλικά και χημικά απαραίτητα για τα στάδια εξαγωγής (extraction) ή συγκέντρωσης δεν συμπεριλαμβάνονται στο kit.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ AFLATOXIN M1 EIA



Χημική σύνθεση της Αflatoξίνης M1

Οι Αflatoξίνες είναι ιδιαίτερα υψηλής τοξικότητας μυκοτοξίνες. Παράγονται από κάποιους μύκητες του γένους *Aspergillus* όπως *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* και του σπάνιου *A. nomius*.

Η Αflatoξίνη M1 είναι το υδροξυλιωμένο προϊόν μεταβολισμού της Αflatoξίνης B1 και ανιχνεύεται σε γάλα από ζώα φάρμας που έχουν καταναλώσει μολυσμένες ζωοτροφές με Αflatoξίνη B1. Οι κύριες πηγές Αflatoξινών στις ζωοτροφές είναι είδη φιστικιών, «σαλαμπόμ» και βαμβάκοσπαρος. Επίσης και το παιδικό γάλα από τον μαστό δύναται να περιέχει Αflatoξίνη M1 εφόσον η μητέρα έχει καταναλώσει τροφές μολυσμένες με Αflatoξίνη B1.

Για την Αflatoξίνη M1, Μέγιστα Όρια Άνοχής (Maximum tolerance Levels) έχουν καθοριστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση ως εξής:

- Γάλα (νωπό γάλα, γάλα προοριζόμενο για την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων και θερμικά επεξεργασμένο γάλα): 0,05 ppb
- Βρεφική φόρμουλα, βρεφικό γάλα: 0,025 ppb
- Διαιτητικά προϊόντα για ειδικούς φαρμακευτικούς σκοπούς προοριζόμενα ειδικά για βρέφη: 0,025 ppb.

Η Euro-Diagnostica έχει αναπτύξει ένα ευαίσθητο Elisa τεστ για παστική ανίχνευση της παρουσίας Αflatoξίνης M1. Το όριο ανίχνευσης (LOD) προσδιορίστηκε σε επίπεδα μικρότερα του 0,006 ng/ml (< 6 ppb) για δείγματα γάλατος.

ΕΔΡΑ: Παλιανού 14, 18758 Κεραιόνη, Αττική • Τηλ: +30 210 4004320

fax: +30 210 4001141

ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΗΜΑ: Συγγρού 85, 56224 Εύοσμος, Θεσσαλονίκη • Τηλ: +30 2310 700110/112

fax: +30 2310 768111

http: www.atropos.gr • e-mail: info@atropos.gr

Σελίδα 1 από 7

12. LITERATURE

1. S.H. Henry, T. Whitaker, I. Rabbani, et al.
Aflatoxin M1. JECFA report 47, 2001 pp 1-108
2. A. Zarpa, C.P. Wild, A.J. Hall, et al.
Aflatoxin M1 in human breast milk from The Gambia, West Africa, quantified by combined monoclonal antibody immunoaffinity chromatography and HPLC. Carcinogenesis, 13, 881-894, 1992.
3. Commission Regulation (EC) No 2174/2003 of 12 December 2003 amending Regulation (EC) No 468/2001 as regards aflatoxins. Off. J. European Commun. L326 (2003) 12-15.
4. Commission Regulation (EC) No 683/2004 of 13 April 2004 amending Regulation (EC) No 468/2001 as regards aflatoxins and ochratoxin A in foods for infants and young children. Off. J. European Commun. L106 (2004) 3-5.

13. ORDERING INFORMATION

For ordering the Aflatoxin M1 EIA kit, use cat. code 5121AFM1p.

AFLATOXIN M1 EIA

A competitive enzyme immunoassay
for quantitative analysis of Aflatoxin M1
in samples of milk and milk products

TABLE OF CONTENTS

	PAGE:
Brief Information	2
1. Introduction	2
2. Principle of the Aflatoxin M1 EIA	3
3. Specificity and Sensitivity	3
4. Handling and Storage	3
5. Kit contents	4
6. Equipment and materials required but not provided	6
7. Precautions	6
8. Sample treatment	7
9. Preparation of reagents	8
10. Assay Procedure	9
11. Interpretation of results	10
12. Literature	12
13. Ordering information	12

Euro-Diagnostica B.V. TEL: + 31 (0)26 3630364
Beijerinckweg 18 FAX: + 31 (0)26 3645111
NL-6827 BN Arnhem E-mail: pob@eurodiagnostica.nl
The Netherlands Web-site: <http://www.eurodiagnostica.com>

5121AFM1p[0]03.08

Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 165/2010 της Επιτροπής, της 26ης Φεβρουαρίου 2010 , για την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 για καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα αναφορικά με τις αφλατοξίνες Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ

Επίσημη Εφημερίδα αριθ. L 050 της 27/02/2010 σ. 0008 - 0012

Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 165/2010 της Επιτροπής

της 26ης Φεβρουαρίου 2010

για την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 για καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα αναφορικά με τις αφλατοξίνες

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

Η ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ,

Έχοντας υπόψη:

τη συνθήκη για τη λειτουργία της Ευρωπαϊκής Ένωσης

τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 315/93 του Συμβουλίου, της 8ης Φεβρουαρίου 1993, για τη θέσπιση κοινοτικών διαδικασιών για τις προσμείξεις των τροφίμων [1], και ιδίως το άρθρο 2 παράγραφος 3,

Εκτιμώντας τα ακόλουθα:

(1) Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 της Επιτροπής, της 19ης Δεκεμβρίου 2006, για καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα [2], ορίζει μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για την αφλατοξίνη Β1 και το σύνολο αφλατοξίνης (αφλατοξίνη Β1 + G1 + Β2 + G2) σε μια σειρά τροφίμων.

(2) Είναι απαραίτητο να τροποποιηθούν ορισμένα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για τις αφλατοξίνες σε ορισμένα τρόφιμα ώστε να ληφθούν υπόψη οι εξελίξεις στον Codex Alimentarius και οι νέες πληροφορίες που περιλαμβάνονται σε πρόσφατες επιστημονικές συμβουλές.

(3) Ο Codex Alimentarius θεσπίζει συνολικό επίπεδο αφλατοξινών 15 µg/kg για τα αμύγδαλα, τα φουντούκια και τα φιστίκια τα προοριζόμενα για περαιτέρω επεξεργασία και ένα συνολικό επίπεδο αφλατοξίνης 10 µg/kg για τα αμύγδαλα, τα φουντούκια και τα φιστίκια που είναι "έτοιμα για κατανάλωση" [3].

(4) Η επιστημονική ομάδα για τις μολυσματικές προσμείξεις στην τροφική αλυσίδα (ομάδα CONTAM) της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (ΕΑΑΤ) ενέκρινε στις 25 Ιανουαρίου 2007 γνώμη σχετικά με την ενδεχόμενη αύξηση του κινδύνου για την υγεία των καταναλωτών από την πιθανή αύξηση των υφιστάμενων

μέγιστων επιπέδων αφλατοξινών για τα αμύγδαλα, τα φουντούκια και τα φιστίκια καθώς και τα παράγωγα προϊόντα [4]. Η ομάδα CONTAM κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η αλλαγή των ανώτατων ορίων για τις συνολικές αφλατοξίνες από 4 σε 8 ή 10 $\mu\text{g/kg}$ για τα αμύγδαλα, τα φουντούκια και τα φιστίκια θα είχε ελάχιστη επίδραση στις εκτιμήσεις της διατροφικής έκθεσης, του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου και των υπολογισμένων περιθωρίων έκθεσης (ΠΕ). Η ομάδα κατέληξε περαιτέρω στο συμπέρασμα ότι η έκθεση σε αφλατοξίνες από όλες τις πηγές πρέπει να είναι τόσο χαμηλή όσο είναι εύλογα εφικτό, επειδή οι αφλατοξίνες είναι γονιδιοτοξικές και καρκινογόνες. Τα στοιχεία δείχνουν ότι μείωση της συνολικής διατροφικής έκθεσης σε αφλατοξίνες θα μπορούσε να επιτευχθεί με τη μείωση του αριθμού υψηλής επιμόλυνσης τροφίμων που διατίθενται στην αγορά μέσω της αποτελεσματικότερης επιβολής της νομοθεσίας και της μείωσης της έκθεσης από άλλες διατροφικές πηγές εκτός από τα αμύγδαλα, τα φουντούκια και τα φιστίκια.

(5) Η ομάδα CONTAM ενέκρινε στις 16 Ιουνίου 2009 δήλωση ως προς τα αποτελέσματα που θα είχε για τη δημόσια υγεία μιας αύξησης του συνολικού επιπέδου αφλατοξίνης από 4 $\mu\text{g/kg}$ σε 10 $\mu\text{g/kg}$ για ακρόδρυα εκτός από αμύγδαλα, φουντούκια και φιστίκια [5]. Η ομάδα κατέληξε ότι με βάση τις πληροφορίες που ήταν διαθέσιμες το 2007 η δημόσια υγεία δεν θα επηρεαζόταν αρνητικά από την αύξηση των επιπέδων για τις συνολικές αφλατοξίνες από 4 g/kg σε 10 g/kg για άλλα ακρόδρυα, συμπεριλαμβανομένων των καρυδιών Βραζιλίας. Λαμβάνοντας υπόψη τις τρέχουσες συζητήσεις στον Codex Alimentarius σχετικά με τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα αφλατοξινών στα καρύδια Βραζιλίας, ενδείκνυται να ευθυγραμμιστεί το επίπεδο αφλατοξινών για τα καρύδια Βραζιλίας με το επίπεδο του Codex για τα αμύγδαλα, τα φουντούκια και τα φιστίκια.

(6) Ο Codex Alimentarius θεσπίζει μόνο ένα μέγιστο όριο για το σύνολο αφλατοξίνης. Το αντίστοιχο επίπεδο αφλατοξίνης B1 προσδιορίστηκε με τη χρησιμοποίηση της βάσης δεδομένων για την παρουσία αφλατοξινών στα τρόφιμα που χρησιμοποιείται από την EAAT για την εκτίμηση της έκθεσης.

(7) Στη γνώμη της EAAT σχετικά με τις αφλατοξίνες παρατηρείται ότι οι ελαιόσποροι και τα παράγωγα προϊόντα συντελούν σημαντικά στην έκθεση του ανθρώπου στην αφλατοξίνη. Η EAAT κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η έκθεση στις αφλατοξίνες από όλες τις πηγές πρέπει να είναι τόσο χαμηλή όσο είναι εύλογα δυνατόν. Επιπλέον, οι κοινοποιήσεις στο σύστημα ταχείας ειδοποίησης για τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές (RASFF) δείχνουν υψηλά επίπεδα αφλατοξινών σε ελαιосπόρους, όπως οι σπόροι ηλίανθου, οι σπόροι πεπονιού κ.λπ. Κατά συνέπεια, προτείνεται να οριστεί επίσης ένα μέγιστο όριο για τους ελαιосπόρους εκτός από τα αράπικα φιστίκια (αραχίδες), σύμφωνα με τα υφιστάμενα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για τα αράπικα φιστίκια (αραχίδες). Εντούτοις, καθώς οι αφλατοξίνες αφαιρούνται σχεδόν εντελώς με τη διαδικασία παραγωγής εξευγενισμένων φυτικών ελαίων, ενδείκνυται να εξαιρεθούν οι ελαιόσποροι, συμπεριλαμβανομένων των αράπικων φιστικιών (αραχίδων), που προορίζονται για σύνθλιψη για την παραγωγή εξευγενισμένου φυτικού ελαίου και το εξευγενισμένο φυτικό έλαιο.

(8) Ένα μέγιστο επίπεδο 2 $\mu\text{g/kg}$ για την αφλατοξίνη B1 και 4 $\mu\text{g/kg}$ για την ολική αφλατοξίνη έχει καθοριστεί για όλα τα δημητριακά και όλα τα προϊόντα που παράγονται από δημητριακά, με εξαίρεση τον αραβόσιτο που θα πρέπει να υποβάλλεται σε διαλογή ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από την κατανάλωση από τον άνθρωπο για το οποίο

έχει οριστεί μέγιστο επίπεδο 5 µg/kg για την αφλατοξίνη B1 και 10 µg/kg για την ολική αφλατοξίνη. Το μη αποφλοιωμένο ρύζι περιέχει κατά κανόνα επίπεδα αφλατοξινών που υπερβαίνουν ελαφρώς τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα. Μετά την άλεση, μια διαδικασία αποφλοιώσης, τα επίπεδα αφλατοξινών στο άσπρο αλεσμένο ρύζι είναι κάτω από τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα. Είναι επομένως ενδεδειγμένο να εφαρμοστεί η ίδια προσέγγιση και για το ρύζι με την υφιστάμενη προσέγγιση για τον αραβόσιτο και να τεθεί ένα υψηλότερο μέγιστο επίπεδο αφλατοξίνης B1 και ολικής αφλατοξίνης για το ρύζι που υποβάλλεται σε διαλογή ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από την κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τη χρήση του ως συστατικού σε τρόφιμα.

(9) Τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα αναφέρονται στο εδάφιο μέρος των ακροδρύων. Εντούτοις, πρόσφατα επιστημονικά στοιχεία έχουν καταδείξει ότι ένα μέρος της επιμόλυνσης με αφλατοξίνη μπορεί να βρεθεί στο κέλυφος των καρυδιών Βραζιλίας. Επομένως, θα πρέπει να τροποποιηθεί η υποσημείωση στο παράρτημα, που υποδεικνύει τη διαδικασία που ακολουθείται σε περίπτωση κατά την οποία αναλύονται ακρόδρυα "με κέλυφος", ώστε να λαμβάνονται υπόψη οι εν λόγω πρόσφατες επιστημονικές πληροφορίες.

(10) Τα μέτρα που προβλέπονται στον παρόντα κανονισμό είναι σύμφωνα με τη γνώμη της μόνιμης επιτροπής για την τροφική αλυσίδα και την υγεία των ζώων,

ΕΞΕΛΩΣΕ ΤΟΝ ΠΑΡΟΝΤΑ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ:

Άρθρο 1

Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 τροποποιείται ως εξής:

1) Το άρθρο 4 αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

"Άρθρο 4

Ειδικές διατάξεις για τα αράπικα φιστίκια, τους ξηρούς καρπούς με κέλυφος, τα ξηρά φρούτα και τον αραβόσιτο

Τα αράπικα φιστίκια (αραχίδες), οι άλλοι ελαιόσποροι, τα ακρόδρυα, οι ξηροί καρποί, το ρύζι και ο αραβόσιτος που δεν συμμορφώνονται με τα κατάλληλα τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα αφλατοξινών που καθορίζονται στα σημεία 2.1.5, 2.1.6, 2.1.7, 2.1.8, της 2.1.10 και 2.1.11 του παραρτήματος μπορούν να διατεθούν στην αγορά υπό τον όρο ότι αυτά τα τρόφιμα:

α) δεν προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή για χρήση ως συστατικά τροφίμων·

β) συμμορφώνονται προς τα κατάλληλα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα που καθορίζονται στα σημεία 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3, 2.1.4, 2.1.9 και 2.1.12 του παραρτήματος·

γ) υποβάλλονται σε κατεργασία διαλογής ή σε άλλες φυσικές μεθόδους κατεργασίας και ότι, μετά την κατεργασία αυτή, δεν υπάρχει υπέρβαση των μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων που καθορίζονται στα σημεία 2.1.5, 2.1.6, 2.1.7, 2.1.8, 2.1.10 και 2.1.11 του παραρτήματος και η εν λόγω κατεργασία δεν δημιουργεί άλλα επιβλαβή κατάλοιπα·

δ) επισημαίνονται ευκρινώς, με αναγραφή της χρήσης για την οποία προορίζονται, και φέρουν την ένδειξη "προϊόν προοριζόμενο να υποστεί κατεργασία διαλογής ή άλλη φυσική κατεργασία προκειμένου να μειωθεί το επίπεδο επιμόλυνσης από αφλατοξίνες πριν από κάθε κατανάλωση από τον άνθρωπο ή χρήση ως συστατικό τροφίμων". Η ένδειξη αυτή περιλαμβάνεται στην επισήμανση κάθε επιμέρους σακούλας, κιβωτίου κ.λπ. ή στο πρωτότυπο έγγραφο που τα συνοδεύει. Ο κωδικός αναγνώρισης φορτίου/παρτίδας σημειώνεται ανεξίτηλα σε κάθε επιμέρους σακούλα, κιβώτιο κ.λπ. του φορτίου και στο πρωτότυπο του συνοδευτικού εγγράφου."

2) Το άρθρο 5 αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

"Άρθρο 5

Ειδικές διατάξεις για τα αράπικα φιστίκια (αραχίδες), άλλους ελαιοσπόρους, τα προϊόντα που παράγονται από αυτά και τα δημητριακά

Στην επισήμανση κάθε επιμέρους σακούλας, κιβωτίου κ.λπ. ή στο πρωτότυπο συνοδευτικό έγγραφο πρέπει να περιέχεται σαφής ένδειξη της χρήσης για την οποία προορίζονται τα προϊόντα αυτά. Το εν λόγω συνοδευτικό έγγραφο πρέπει να συνδέεται σαφώς με το φορτίο, αναφέροντας τον κωδικό αναγνώρισης του φορτίου, ο οποίος υπάρχει σε κάθε επιμέρους σακούλα, κιβώτιο του φορτίου κ.λπ. Επιπλέον, η επιχειρηματική δραστηριότητα του παραλήπτη του φορτίου, η οποία αναγράφεται στο συνοδευτικό έγγραφο, πρέπει να είναι συμβατή με τη χρήση για την οποία προορίζονται τα εν λόγω προϊόντα.

Εάν δεν υπάρχει σαφής ένδειξη ότι η χρήση για την οποία προορίζονται δεν είναι η κατανάλωση από τον άνθρωπο, τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα που καθορίζονται στα σημεία 2.1.5 και 2.1.11 του παραρτήματος ισχύουν για όλα τα αράπικα φιστίκια, για άλλους ελαιοσπόρους τα προϊόντα που παράγονται από αυτά και για τα δημητριακά τα οποία διατίθενται στην αγορά.

Όσον αφορά τα εξαιρούμενα αράπικα φιστίκια (αραχίδες) και άλλους ελαιοσπόρους που προορίζονται για σύνθλιψη και την εφαρμογή των μέγιστων επιτρεπομένων επιπέδων που καθορίζονται στο σημείο 2.1.1 του παραρτήματος, η εξαίρεση ισχύει μόνο για φορτία που επισημαίνονται σαφώς με υπόδειξη της χρήσης τους και φέρουν την ένδειξη "προϊόν προοριζόμενο για σύνθλιψη για την παραγωγή εξευγενισμένου φυτικού ελαίου". Η ένδειξη θα αναφέρεται στην ετικέτα κάθε επιμέρους σακούλας, κιβωτίου κ.λπ. και στο(-α) συνοδευτικό(-ά) έγγραφο(-α). Ο τελικός προορισμός πρέπει να είναι εγκατάσταση σύνθλιψης."

3) Το παράρτημα τροποποιείται ως εξής:

α) το υποτίμημα 2.1 (αφλατοξίνες) αντικαθίσταται από το κείμενο του παραρτήματος του παρόντος κανονισμού·

β) η υποσημείωση 5 αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

"(5) Τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα αναφέρονται στο βρώσιμο μέρος των αράπικων φιστικιών (αραχίδων) και των ακροδρύων. Εάν τα αράπικα φιστίκια (αραχίδες) και τα ακρόδρυα "στο κέλυφος" αναλυθούν, κατά τον υπολογισμό της περιεκτικότητας σε

αφλατοξίνη θεωρείται ότι το σύνολο της μόλυνσης βρίσκεται στο εδώδιμο μέρος, εκτός από την περίπτωση των καρυδιών Βραζιλίας."

γ) προστίθενται οι ακόλουθες υποσημειώσεις:

"(40) Ελαιόσποροι που εμπίπτουν στους κωδικούς ΣΟ 1201, 1202, 1203, 1204, 1205, 1206, 1207 και παράγωγα προϊόντα ΣΟ 1208 οι σπόροι πεπονιού εμπίπτουν στον κωδικό ex120799.

(41) Σε περίπτωση που τα παράγωγα/επεξεργασμένα προϊόντα αυτών παράγονται/υποβάλλονται σε επεξεργασία αποκλειστικά ή σχεδόν αποκλειστικά από τα υπόψη ακρόδρυα, τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα όπως ισχύουν για τα αντίστοιχα ακρόδρυα ισχύουν επίσης και για τα παράγωγα/επεξεργασμένα προϊόντα.Στις άλλες περιπτώσεις, το άρθρο 2 παράγραφος 1 και το άρθρο 2 παράγραφος 2 ισχύουν για τα παράγωγα/επεξεργασμένα προϊόντα."

Άρθρο 2

Ο παρών κανονισμός δεν ισχύει για πυρήνες βερίκοκων, ελαιόσπορους, εκτός από τα αράπικα φιστίκια (αραχίδες) και κατεργασμένα προϊόντα αυτών, τα οποία είχαν διατεθεί στην αγορά κατά ημερομηνία προγενέστερη της ημερομηνίας υποβολής της αίτησης σύμφωνα με τις διατάξεις που ίσχυαν κατ' εκείνη την ημερομηνία.

Το βάρος της απόδειξης σχετικά με το πότε διατέθηκαν τα προϊόντα στην αγορά φέρουν οι υπεύθυνοι των επιχειρήσεων τροφίμων.

Άρθρο 3

Ο παρών κανονισμός αρχίζει να ισχύει τη δεκάτη ημέρα από τη δημοσίευσή του στην Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Θα εφαρμόζεται από την ημερομηνία έναρξης ισχύος.

Ο παρών κανονισμός είναι δεσμευτικός ως προς όλα τα μέρη του και ισχύει άμεσα σε κάθε κράτος μέλος.

Βρυξέλλες, 26 Φεβρουαρίου 2010.

Για την Επιτροπή

Ο Πρόεδρος

José Manuel Barroso

[1] ΕΕ L 37 της 13.2.1993, σ. 1.

[2] ΕΕ L 364 της 20.12.2006, σ. 5.

[3] Γενικό πρότυπο Codex για τις ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα και τις τοξίνες στα τρόφιμα (CODEX STAN 193-1995)
http://www.codexalimentarius.net/download/standards/17/CXS_193e.pdf

[4] Δελτίο EFSA (2007) 446, 1-127.
http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific_Opinion/CONTAM%20_op_ej446_aflatoxins_en,3.pdf?ssbinary=true

[5] Δήλωση της Επιστημονικής ομάδας για τις μολυσματικές προσμείξεις στην τροφική αλυσίδα μετά από αίτημα της Ευρωπαϊκής Επιτροπής αναφορικά με τις επιπτώσεις στη δημόσια υγεία μιας αύξησης των επιπέδων για το σύνολο της αφλατοξίνης από 4 µg/kg 10 µg/kg για ξηρούς καρπούς δέντρων εκτός από αμύγδαλα, φουντούκια και φυστίκια.
Δελτίο EFSA (2009) 1168, 1-11.
http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Statement/contam_statement_ej1168_aflatoxin_other_treenuts_en.pdf?ssbinary=true

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Τρόφιμα (1) | Μέγιστες τιμές ανοχής (µg/kg) |

"2.1. | Αφλατοξίνες | B1 | Αθροισμα της αφλατοξίνης B1, B2, G1 και G2 | M1 |

2.1.1. | Τα αράπικα φιστίκια (αραχίδες) και άλλοι ελαιόσποροι (40), που υπόκεινται σε διαλογή ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από την κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τη χρήση ως συστατικό σε τρόφιμα με εξαίρεση: τα αράπικα φιστίκια (αραχίδες) και τους άλλους ελαιόσπορους για σύνθλιψη για την παραγωγή εξευγενισμένου φυτικού ελαίου | 8,0 (5) | 15,0 (5) | — |

2.1.2. | Αμύγδαλα, φυστίκια και πυρήνες βερίκοκων που υπόκεινται σε διαλογή ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από την κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τη χρήση ως συστατικό σε τρόφιμα | 12,0 (5) | 15,0 (5) | — |

2.1.3. | Φουντούκια και καρύδια Βραζιλίας, που υπόκεινται σε διαλογή ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από την κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τη χρήση ως συστατικό σε τρόφιμα | 8,0 (5) | 15,0 (5) | |

2.1.4. | Ακρόδρυα, εκτός από τα ακρόδρυα που αναφέρονται στα σημεία 2.1.2 και 2.1.3, που υπόκεινται σε διαλογή ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από την κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τη χρήση ως συστατικό σε τρόφιμα | 5,0 (5) | 10,0 (5) | — |

2.1.5. | Τα αράπικα φιστίκια (αραχίδες) και οι άλλοι ελαιόσποροι (40) και τα επεξεργασμένα προϊόντα αυτών που προορίζονται για την άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τη χρήση ως συστατικό σε τρόφιμα, με εξαίρεση: τα ακατέργαστα φυτικά έλαια που προορίζονται για εξευγενισμό εξευγενισμένα φυτικά έλαια | 2,0 (5) | 4,0 (5) | — |

- 2.1.6. | Αμύγδαλα, φυστίκια και πυρήνες βερίκοκων, προοριζόμενοι για την άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή για τη χρήση ως συστατικό σε τρόφιμα (41) | 8,0 (5) | 10,0 (5) | — |
- 2.1.7. | Φουντούκια και καρύδια Βραζιλίας, προοριζόμενα για την άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τη χρήση ως συστατικό σε τρόφιμα (41) | 5,0 (5) | 10,0 (5) | |
- 2.1.8. | Ακρόδρυα, εκτός από τα ακρόδρυα που αναφέρονται στα σημεία 2.1.6 και 2.1.7, και μεταποιημένα προϊόντα αυτών, που προορίζονται για την άμεση ανθρώπινη κατανάλωση ή τη χρήση ως συστατικό σε τρόφιμα | 2,0 (5) | 4,0 (5) | — |
- 2.1.9. | Ξηρά φρούτα που υφίστανται κατεργασία διαλογής ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από την κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τη χρήση ως συστατικά σε τρόφιμα. | 5,0 | 10,0 | — |
- 2.1.10. | Ξηρά φρούτα και μεταποιημένα προϊόντα τους που προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή για χρήση ως συστατικά σε τρόφιμα. | 2,0 | 4,0 | — |
- 2.1.11. | Όλα τα δημητριακά και όλα τα παράγωγα προϊόντα αυτών, συμπεριλαμβανομένων των μεταποιημένων προϊόντων δημητριακών, εξαιρουμένων των τροφίμων που παρατίθενται στα σημεία 2.1.12, 2.1.15 και 2.1.17 | 2,0 | 4,0 | — |
- 2.1.12. | Ο αραβόσιτος και το ρύζι που υπόκεινται σε διαλογή ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από την κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τη χρήση ως συστατικό σε τρόφιμα. | 5,0 | 10,0 | — |
- 2.1.13. | Νωπό γάλα (6), γάλα που υφίσταται θερμική επεξεργασία και γάλα για την παρασκευή προϊόντων με βάση το γάλα | — | — | 0,050 |
- 2.1.14. | Τα εξής είδη καρυκευμάτων: *Capsicum* spp (αποξηραμένοι καρποί, ολόκληροι ή αλεσμένοι, συμπεριλαμβανομένου του τσίλι, του τσίλι σε σκόνη, του καγιέν και της πάπρικας) *Piper* spp (καρποί, συμπεριλαμβανομένου του λευκού και του μαύρου πιπεριού) *Myristica fragrans* (μοσχοκάρυδο) *Zingiber officinale* (ζιγγίβερη) *Curcuma longa* (κούρκουμα) Μείγμα καρυκευμάτων που περιέχει ένα ή περισσότερα από τα προαναφερόμενα καρυκεύματα | 5,0 | 10,0 | — |
- 2.1.15. | Μεταποιημένα τρόφιμα με βάση τα δημητριακά και παιδικές τροφές για βρέφη και μικρά παιδιά (3) (7) | 0,10 | — | — |
- 2.1.16. | Παρασκευάσματα για βρέφη και παρασκευάσματα δεύτερης βρεφικής ηλικίας, συμπεριλαμβανομένου του γάλακτος για βρέφη και του γάλακτος δεύτερης βρεφικής ηλικίας (4) (8) | — | — | 0,025 |
- 2.1.17. | Διαιτητικά τρόφιμα για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς (9) (10) που προορίζονται ειδικά για βρέφη | 0,10 | — | 0,025" |

Πρόταση ΟΔΗΓΙΑΣ ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ που τροποποιεί την οδηγία 95/53/ΕΚ του Συμβουλίου για τον καθορισμό των αρχών οργάνωσης των επίσημων ελέγχων στον τομέα της διατροφής των ζώων, καθώς και την οδηγία 1999/29/ΕΚ του Συμβουλίου σχετικά με τις ανεπιθύμητες ουσίες και προϊόντα στη διατροφή των ζώων

(υποβληθείσα από την Επιτροπή)

ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΚΘΕΣΗ

Στην οδηγία 95/53/ΕΚ του Συμβουλίου της 25ης Οκτωβρίου 1995 καθορίζονται οι αρχές που διέπουν την οργάνωση των επίσημων ελέγχων στον τομέα της διατροφής των ζώων.

I. Υφιστάμενη κατάσταση

Ο κύριος στόχος της ισχύουσας οδηγίας είναι η εναρμόνιση των επίσημων ελέγχων που πραγματοποιούνται από τις αρμόδιες αρχές των κρατών μελών, τόσο όσον αφορά τις εισαγωγές όσο και τις συναλλαγές εντός της Κοινότητας.

Η οδηγία καλύπτει όλα τα προϊόντα και τις ουσίες που χρησιμοποιούνται στη διατροφή των ζώων και προβλέπονται οι βασικές διατάξεις που αφορούν :

- Τις αρχές για τη διεξαγωγή των ελέγχων.
- Τους συστηματικούς ελέγχους των εγγράφων και την τυχαία ταυτοποίηση, καθώς και τους φυσικούς ελέγχους των εισαγωγών.
- Την ενίσχυση των ελέγχων στο αρχικό σημείο και τη διοργάνωση ελέγχων στον τόπο προορισμού, στο πλαίσιο της ενιαίας αγοράς.
- Τη διαδικασία συνεργασίας μεταξύ των κρατών μελών σε περίπτωση που διαπιστώνονται παραβάσεις και, στην περίπτωση αυτή, τη δυνατότητα διεξαγωγής επιθεωρήσεων από την Επιτροπή, καθώς και την έγκριση μέτρων προστασίας.
- Την απαίτηση να καταρτίζουν τα κράτη μέλη εθνικά ετήσια προγράμματα επιθεώρησης.
- Την απαίτηση να αποστέλλουν τα κράτη μέλη προς την Επιτροπή έκθεση σχετικά με την υλοποίηση των εθνικών προγραμμάτων, με αρχή τον Απρίλιο 2000.
- Με βάση τα ανωτέρω στοιχεία, την απαίτηση να υποβάλλει η Επιτροπή κάθε έτος, με αρχή τον Οκτώβριο 2000, μια γενική συνοπτική έκθεση και πρόταση σύστασης που θα αφορά ένα συντονισμένο κοινοτικό πρόγραμμα ελέγχου.

Η οδηγία εφαρμόζεται από την 1η Μαΐου 1998.

II. Τροποποιήσεις που έχουν ήδη προταθεί από την Επιτροπή

Μετά από την ανίχνευση διοξίνης σε πολύ εσπεριδοειδών προς χρήση στις ζωοτροφές που εισάγονται στην Κοινότητα, η Επιτροπή υπέβαλε στο Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο και στο Συμβούλιο την πρόταση COM(1998) 602 τελικό, για την τροποποίηση της οδηγίας 95/53/EK. Η πρόταση βρίσκεται επί του παρόντος στο Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο για δεύτερη ανάγνωση.

Σκοπός της πρότασης είναι να δημιουργηθεί η νομική βάση για βελτιωμένη εναρμόνιση των ελέγχων σε προϊόντα από τρίτες χώρες κατά την εισαγωγή και πριν από τη διάθεση στο εμπόριο.

Επιπλέον, επεκτείνεται η νομική βάση για την διεξαγωγή επιτόπου επιθεωρήσεων της Επιτροπής τόσο στα κράτη μέλη όσο και στις τρίτες χώρες και παρέχεται η δυνατότητα στην Επιτροπή, όταν αντιμετωπίζει σοβαρό κίνδυνο, να εγκρίνει μέτρο διασφάλισης για προϊόντα καταγωγής τρίτων χωρών.

Η πρόταση παρέχει επίσης τη δυνατότητα στην Επιτροπή να απαιτεί από τα κράτη μέλη να εφαρμόζουν ειδικά στοχοθετημένα προγράμματα επιθεώρησης, εφόσον είναι σκόπιμο. Τα προγράμματα αυτά εφαρμόζονται συμπληρωματικά σε σχέση με το ετήσιο πρόγραμμα γενικού ελέγχου, με σκοπό τη διαμόρφωση ενός ελαστικότερου πλαισίου.

III. Η ανάγκη υποβολής επιπλέον πρότασης για την τροποποίηση της οδηγίας 95/53/EK

Μετά από την κρίση της διοξίνης, τον Μάιο του 1999, η Επιτροπή εξήγγειλε νομοθετικό πρόγραμμα για τη βελτίωση της νομικής διάταξης που ρυθμίζει την ασφάλεια των τροφίμων. Το πρόγραμμα εγκρίθηκε από το Συμβούλιο και το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο και συμπεριλάμβανε επίσης ανασκόπηση της οδηγίας 95/53/EK.

Εντοπίστηκαν οι ακόλουθες κατηγορίες θεμάτων

1. Προβλήματα που διαπιστώθηκαν μετά από την πρόσφατη κρίση της διοξίνης

- Κατά τη διεξαγωγή επιθεώρησης από την Επιτροπή, προέκυψαν και εντοπίστηκαν ελλείψεις ως προς τη διαχείριση της κρίσης και ειδικότερα ανεπαρκής συντονισμός μεταξύ των διαφόρων αρχών.

- Η Επιτροπή ήταν σε θέση να θεσπίσει επείγοντα μέτρα διασφάλισης που κάλυπταν τις ζωοτροφές μόνον επειδή η μόλυνση οφείλετο σε ένα προϊόν υποτιθέμενης ζωικής προέλευσης.

- Τα στοιχεία σχετικά με τη μόλυνση από διοξίνη παρασχέθηκαν καθυστερημένα στην Επιτροπή και τα ληφθέντα μέτρα σε εθνική κλίμακα ήσαν ανεπαρκή.

2. Άλλα προβλήματα που απαιτούν επίλυση

- Παρά το γεγονός ότι κατά τη διάρκεια των επίσημων ελέγχων σε ένα κράτος μέλος, διαπιστώθηκε η χρησιμοποίηση ιλύος στις ζωοτροφές, δεν υπήρχε ένα σύστημα που να επιβάλει την έγκαιρη διαβίβαση των σχετικών στοιχείων στην Επιτροπή, έτσι ώστε να ειδοποιηθούν τα λοιπά κράτη μέλη.

- Η σχέση που έχουν οι ζωοτροφές με την παραγωγή ασφαλών τροφίμων απαιτεί την υποχρεωτική εφαρμογή των συντονισμένων ετήσιων προγραμμάτων επιθεώρησης σε κοινοτική κλίμακα.

3. Προσαρμογή των αναφορών σε άλλες νομοθετικές πράξεις της Κοινότητας και προσθήκη διατάξεων που προβλέπονται από άλλες νομοθετικές πράξεις για τις ζωοτροφές στην οδηγία 95/53/EK

- Πρέπει να τροποποιηθούν οι αναφορές στην οδηγία 74/63/EK του Συμβουλίου, η οποία κωδικοποιήθηκε σε ενιαίο κείμενο με την οδηγία 99/29/EK του Συμβουλίου για τις ανεπιθύμητες ουσίες και προϊόντα στις ζωοτροφές.

- Όσον αφορά την εναρμόνιση των όρων στον τομέα της διατροφής των ζώων, απαιτείται επίσης η διόρθωση του ορισμού που αφορά την κυκλοφορία των προϊόντων που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στη διατροφή των ζώων (στο ελληνικό κείμενο "θέση σε εμπορία") όπως ορίζεται στην οδηγία 96/25/EK του Συμβουλίου για την κυκλοφορία των πρώτων υλών ζωοτροφών.

- Για λόγους συνέπειας, οι απαιτήσεις σχετικά με την ενημέρωση των επίσημων αρχών σε περίπτωση που ανακύπτουν προβλήματα στις ζωοτροφές, απαιτήσεις που επί του παρόντος αποτελούν τμήμα της οδηγίας 99/29/EK του Συμβουλίου, θα καταργηθούν και θα συμπεριληφθούν στην οδηγία 95/53/EK.

4. Ορισμένες απόψεις εν αναμονή της υποβολής άλλων κοινοτικών νομοθετικών προτάσεων

- Με βάση την οδηγία 92/59/ΕΟΚ του Συμβουλίου σχετικά με τη γενική ασφάλεια των προϊόντων, η Επιτροπή διαχειρίζεται επί του παρόντος ένα σύστημα έγκαιρης προειδοποίησης για κινδύνους που προκύπτουν από τα τρόφιμα. Η Επιτροπή εξετάζει επί του παρόντος το ενδεχόμενο να συμπεριληφθεί η ασφάλεια των ζωοτροφών στην προαναφερθείσα οδηγία. Εν αναμονή της επανεξέτασης της προαναφερθείσας οδηγίας, το σύστημα πληροφόρησης για καταστάσεις επείγουσας ανάγκης σχετικά με τις ζωοτροφές, το οποίο προβλέπεται στην παρούσα οδηγία, ενδέχεται να εφαρμοστεί στο πλαίσιο του υφιστάμενου συστήματος έγκαιρης προειδοποίησης που προβλέπεται στην οδηγία 92/59/ΕΟΚ.

- Δύνανται επίσης να προταθούν οριζόντια μέτρα που θα καλύπτουν τους ελέγχους στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές, στο πλαίσιο του ανακοινωθέντος Λευκού Βιβλίου της Επιτροπής για την ασφάλεια των τροφίμων. Εν αναμονή της έγκρισης των εν λόγω μέτρων είναι ωστόσο σημαντικό να τροποποιηθεί η οδηγία 95/53/EK.

IV. Περίληψη των προτεινόμενων τροποποιήσεων

Λαμβάνοντας υπόψη τα ανωτέρω στοιχεία, προτείνεται η τροποποίηση της οδηγίας ως εξής :

1. Τα κράτη μέλη θα είναι υποχρεωμένα να διαθέτουν ενδεδειγμένα σχέδια έκτακτης ανάγκης για την αντιμετώπιση σοβαρών κινδύνων που αφορούν τις ζωοτροφές.

2. Η Επιτροπή θα είναι σε θέση να λάβει προσωρινά μέτρα προστασίας για τις ζωοτροφές και τα προϊόντα που χρησιμοποιούνται στη διατροφή των ζώων και παράγονται εντός της Κοινότητας, σε περίπτωση που ανακύψουν σοβαροί κίνδυνοι για τη δημόσια υγεία, την υγεία των ζώων ή για το περιβάλλον.

3. Τα κράτη μέλη θα πρέπει να ενημερώνουν την Επιτροπή αμέσως όταν διαπιστωθεί σοβαρή μόλυνση ή κίνδυνος μόλυνσης και εξαπλωθεί στην αλυσίδα παραγωγής ζωοτροφών και τροφίμων, ή εφόσον είναι πιθανόν να εξαπλωθεί σε άλλες χώρες, και υποχρεούνται να παράσχουν τα εν λόγω στοιχεία σε εναρμονισμένη μορφή.

4. Τα κράτη μέλη υποχρεούνται να ενημερώνουν την Επιτροπή εφόσον αυξάνεται η συχνότητα κάποιας συγκεκριμένης μόλυνσης ή κινδύνου.

5. Τα κράτη μέλη υποχρεούνται να περιλαμβάνουν στην ετήσια έκθεση που υποβάλλουν στην Επιτροπή σχετικά με τις ελεγκτικές δραστηριότητές τους στον τομέα των ζωοτροφών, όλα τα στοιχεία που αφορούν μια περιστασιακή και περιορισμένη μόλυνση ή κινδύνους.

6. Με βάση τις ετήσιες εκθέσεις των κρατών μελών, η Επιτροπή θα προβεί στην έκδοση απόφασης αντί για σύσταση, ώστε να διασφαλιστεί, με το ενδεδειγμένο νομικό μέσο, η υλοποίηση των συντονισμένων προγραμμάτων ελέγχου για το επόμενο έτος.

7. Η ανταλλαγή πληροφοριών για τις περιπτώσεις έκτακτης ανάγκης που αφορούν προϊόντα που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στη διατροφή των ζώων, θα πραγματοποιείται με το υφιστάμενο σύστημα που εφαρμόζεται σε κοινοποιήσεις επείγουσας ανάγκης που αφορούν τα τρόφιμα.

8. Θα δημιουργηθεί μια νομική βάση για την εναρμόνιση όλων των στοιχείων που διαβιβάζονται σχετικά με τους ελέγχους στον τομέα των ζωοτροφών καθώς και σχετικά με την ασφάλεια των ζωοτροφών.

9. Με τις προτεινόμενες τροποποιήσεις, όχι μόνο θα υπάρξει μια νομική βάση για την ανάληψη δράσης σε περίπτωση σοβαρής μόλυνσης των ζωοτροφών, αλλά τα κράτη μέλη θα διαθέτουν την κατάλληλη επιχειρησιακή δομή για την αντιμετώπιση περιπτώσεων επείγουσας ανάγκης στον τομέα των ζωοτροφών.

Επιπλέον, με τον έλεγχο της μόλυνσης και των κινδύνων σε κοινοτική κλίμακα, δύνανται να εγκριθούν ειδικά προγράμματα ελέγχου, να επιλεγούν προτεραιότητες για τα συντονισμένα ετήσια προγράμματα ελέγχου και να θεσπιστούν ειδικοί όροι, με βάση την κτηθείσα πείρα, για την έγκριση ή την επίσημη καταχώρηση εγκαταστάσεων ή εμπορευομένων που χειρίζονται ορισμένα προϊόντα στα οποία έχουν διαπιστωθεί κίνδυνοι.

2000/0068 (COD)

Πρόταση ΟΔΗΓΙΑΣ ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ που τροποποιεί την οδηγία 95/53/EK του Συμβουλίου για τον καθορισμό των αρχών οργάνωσης των επίσημων ελέγχων στον τομέα της διατροφής των ζώων, καθώς και την οδηγία 1999/29/EK του Συμβουλίου σχετικά με τις ανεπιθύμητες ουσίες και προϊόντα στη διατροφή των ζώων

(Κείμενο με ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

ΤΟ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟ ΚΑΙ ΤΟ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ ΤΗΣ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗΣ ΕΝΩΣΗΣ,

Έχοντας υπόψη :

τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Κοινότητας, και ιδίως το άρθρο 152 παράγραφος 4 σημείο β),

την πρόταση της Επιτροπής [1],

[1] ΕΕ ...

τη γνώμη της Οικονομικής και Κοινωνικής Επιτροπής [2],

[2] ΕΕ ...

τη γνώμη της Επιτροπής των Περιφερειών [3],

[3] ΕΕ ...

αποφασίζοντας σύμφωνα με τη διαδικασία που αναφέρεται στο άρθρο 251 της συνθήκης,

Εκτιμώντας τα εξής :

(1) Η ασφάλεια των προϊόντων που προορίζονται για τη διατροφή των ζώων αποτελεί κύριο μέλημα και είναι απαραίτητο να διασφαλιστεί ότι τα προϊόντα που διατίθενται στην αγορά για τη διατροφή των ζώων είναι ασφαλή. Η οδηγία 95/53/ΕΚ [4] του Συμβουλίου της 25ης Οκτωβρίου 1995 για τον καθορισμό των αρχών οργάνωσης των επίσημων ελέγχων στον τομέα της διατροφής των ζώων, συμβάλει στην υλοποίηση του εν λόγω στόχου. Είναι απαραίτητο να τροποποιηθεί η οδηγία 95/53 για τους ακόλουθους λόγους.

[4] ΕΕ L 265, 8.11.1995, σ. 17

(2) Η οδηγία 74/63/ΕΟΚ [5] του Συμβουλίου έχει αντικατασταθεί από την οδηγία 1999/29/ΕΚ [6] του Συμβουλίου της 22ας Απριλίου 1999 σχετικά με τις ανεπιθύμητες ουσίες και προϊόντα στη διατροφή των ζώων. Κατά συνέπεια, πρέπει να τροποποιηθούν οι αναφορές στην οδηγία 74/63/ΕΟΚ.

[5] ΕΕ L 38, 11.02.1974, σ. 31 όπως τροποποιήθηκε τελευταία με την οδηγία 98/60/ΕΚ της Επιτροπής (ΕΕ L 209, 25.07.1998 σ. 50)

[6] ΕΕ L 115, 04.05.1999, σ. 32

(3) Σχετικά με την αναφορά στην κυκλοφορία προϊόντων που χρησιμοποιούνται για τη διατροφή των ζώων, είναι απαραίτητο να εναρμονιστούν οι ορισμοί των εν λόγω προϊόντων με την πλέον πρόσφατη κοινοτική νομοθεσία.

(4) Πρόσφατα παρουσιάστηκε δύο φορές σοβαρή μόλυνση από διοξίνη σε πρώτες ύλες ζωοτροφών και σε ζωοτροφές. Από την κτηθείσα πείρα που προήλθε από τις εν λόγω μολύνσεις, προκύπτει ότι είναι απαραίτητο να βελτιωθούν οι διαδικασίες τόσο ως προς τη λήψη μέτρων προστασίας όσο και για την ανταλλαγή πληροφοριών μεταξύ των κρατών μελών και της Επιτροπής σε περίπτωση που διαπιστωθεί ότι ορισμένα προϊόντα που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για τη διατροφή των ζώων είναι ακατάλληλα και σε περίπτωση άμεσου κινδύνου για τη δημόσια υγεία, την υγεία των ζώων ή για περιβάλλον.

(5) Το αποτέλεσμα ενός ελέγχου που πραγματοποίησε η Επιτροπή μετά από την μόλυνση από διοξίνη της αλυσίδας παραγωγής ζωοτροφών και τροφίμων, οδήγησε στον εντοπισμό λειτουργικών ανεπαρειών στη διαχείριση της κρίσης της διοξίνης. Με βάση την κτηθείσα πείρα, είναι απαραίτητο να θεσπιστούν διατάξεις που θα απαιτούν από τα κράτη μέλη να διαθέτουν σχέδια παρέμβασης για την αντιμετώπιση καταστάσεων επείγουσας ανάγκης στον τομέα της διατροφής των ζώων. Τα εν λόγω σχέδια παρέμβασης είναι επίσης απαραίτητα για την ενδεδειγμένη συλλογή των αναγκαίων στοιχείων.

(6) Σε περίπτωση που εμφανιστεί σε ένα κράτος μέλος κάποιος σοβαρός και άμεσος κίνδυνος για την υγεία των ζώων, λόγω της μόλυνσης των ζωοτροφών, είναι απαραίτητο να είναι σε θέση η Επιτροπή να λαμβάνει όλα τα αναγκαία προληπτικά μέτρα για την προστασία της δημόσιας υγείας και της υγείας των ζώων. Κατά συνέπεια, η Επιτροπή πρέπει ιδίως να έχει τη δυνατότητα να αναστέλλει τις συναλλαγές και τις εξαγωγές από το συγκεκριμένο κράτος μέλος ή τμήμα του κράτους μέλους και/ή να θεσπίζει ειδικούς όρους για τα σχετικά προϊόντα ή ουσίες.

(7) Η Επιτροπή θα πρέπει να είναι σε θέση να λαμβάνει προσωρινά μέτρα προστασίας, που θα εφαρμόζονται σε αρχικό στάδιο της τροφικής αλυσίδας, ιδίως σε επίπεδο πρώτων υλών ζωοτροφών και ζωοτροφών, έτσι ώστε να βελτιωθεί η αποτελεσματικότητα σχετικά με τη μείωση εξάπλωσης ενός κινδύνου. Η αποτελεσματικότητα αυτή εξαρτάται επίσης από την ενιαία εφαρμογή των εν λόγω προσωρινών μέτρων προστασίας σε ολόκληρη την Κοινότητα.

(8) Η οδηγία 1999/29/EK καθορίζει τα ανώτατα επιτρεπόμενα όρια για ορισμένες ανεπιθύμητες ουσίες και προϊόντα των οποίων η παρουσία δεν δύναται να αποκλειστεί πλήρως σε ορισμένες πρώτες ύλες ζωοτροφών ή ζωοτροφές.

(9) Με την οδηγία 1999/29/EK θεσπίστηκε ένα σύστημα, σε επίπεδο επίσημου ελέγχου, για τη διευκόλυνση των κρατών μελών να ενημερώνονται από τους εμπορευόμενους, σε όλα τα στάδια της αλυσίδας παραγωγής ζωοτροφών, σχετικά με περιπτώσεις μη τήρησης της προαναφερθείσας οδηγίας για τα ανεπιθύμητα προϊόντα και ουσίες. Επί του παρόντος η υποχρέωση να ενημερώνονται τα λοιπά κράτη μέλη και η Επιτροπή επιβάλλεται εφόσον μια παρτίδα πρώτων υλών ζωοτροφών ή ζωοτροφών, η οποία δεν πληροί τις διατάξεις της οδηγίας, είναι πιθανόν να αποσταλεί σε άλλα κράτη μέλη.

(10) Το εν λόγω σύστημα ενημέρωσης απαιτείται να ενσωματωθεί στην οδηγία 95/53/EK, έτσι ώστε να δύναται να εφαρμοστεί μελλοντικά σε όλες τις περιπτώσεις που ένα προϊόν θέτει σε κίνδυνο τη δημόσια υγεία, την υγεία των ζώων ή το περιβάλλον, καθώς και για λόγους βελτίωσης του συστήματος ελέγχου στο σύνολό του.

(11) Δεν είναι δυνατόν να απαριθμηθούν όλες οι δυνητικές επικίνδυνες μολύνσεις βιολογικής ή χημικής προέλευσης, οι οποίες ενδέχεται να προκύψουν τυχαία ή από παράνομες ενέργειες και ενδέχεται να μολύνουν ένα προϊόν που προορίζεται να χρησιμοποιηθεί για τη διατροφή των ζώων.

(12) Πρέπει να εξεταστούν οι δυνητικοί κίνδυνοι που έχουν την προέλευσή τους στη λανθασμένη σήμανση ή προκύπτουν κατά την μεταχείριση, τη μεταφορά, την αποθήκευση ή την επεξεργασία.

(13) Για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας του συστήματος ελέγχων καθώς και των σχετικών μέτρων, τα κράτη μέλη πρέπει να είναι υποχρεωμένα να επαληθεύουν τη φύση και την έκταση της μόλυνσης και να καταβάλλουν κάθε προσπάθεια για τον εντοπισμό της προέλευσής της, έτσι ώστε να ανιχνεύεται κάθε άλλη πιθανή μόλυνση.

(14) Η οδηγία 95/53/EK προβλέπει ότι τα κράτη μέλη θα υποβάλλουν στην Επιτροπή στοιχεία σχετικά με τα αποτελέσματα των ελέγχων που διεξάγονται κάθε έτος και για πρώτη φορά πριν από την 1η Απριλίου 2000. Η οδηγία προβλέπει επίσης ότι οι εν λόγω εκθέσεις θα χρησιμοποιηθούν από την Επιτροπή για τη σύνταξη και την υποβολή μιας γενικής συνοπτικής έκθεσης σχετικά με τους ελέγχους που διεξάγονται σε κοινοτική κλίμακα, καθώς και μιας πρότασης σχετικά με ένα συντονισμένο πρόγραμμα επιθεώρησης για το επόμενο έτος. Τα στοιχεία τα σχετικά με την μόλυνση που επηρεάζει την ασφάλεια ενός προϊόντος που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για τη διατροφή των ζώων, θα εξετάζονται από τα κράτη μέλη και την Επιτροπή κατά τον καθορισμό των προτεραιοτήτων για την κατάρτιση των ετήσιων συντονισμένων προγραμμάτων επιθεώρησης. Όλα τα στοιχεία που συλλέγονται σχετικά με τους κινδύνους για τη δημόσια υγεία, την υγεία των ζώων ή για το περιβάλλον και αφορούν την κυκλοφορία και τη χρησιμοποίηση προϊόντων που προορίζονται για τη διατροφή των ζώων, θα εξετάζονται ικανοποιητικότερα εφόσον παρέχονται υπό εναρμονισμένη και τυποποιημένη μορφή. Κατά συνέπεια, είναι σκόπιμο να παρακολουθείται η εμφάνιση ορισμένων περιπτώσεων μόλυνσης ή η μόλυνση που αφορά ορισμένα προϊόντα ή μεθόδους που ενδέχεται να δημιουργήσουν κινδύνους.

(15) Η ενιαία και εναρμονισμένη εφαρμογή των προγραμμάτων ελέγχου σε κοινοτική κλίμακα, είναι απαραίτητη για την εγγύηση της ασφάλειας των προϊόντων που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στη διατροφή των ζώων, ενώ το νομικό μέσο που αποτελεί μια απόφαση παρέχει ικανοποιητικότερες εγγυήσεις ως προς την εφαρμογή της σε σχέση με μια σύσταση και τούτο πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την κατάρτιση των συντονισμένων προγραμμάτων ελέγχου.

(16) Έχουν θεσπιστεί διαδικασίες για την ανταλλαγή πληροφοριών σε καταστάσεις έκτακτης ανάγκης, δυνάμει της οδηγίας 92/59/ΕΟΚ [7] του Συμβουλίου σχετικά με την γενική ασφάλεια των προϊόντων και οι διαδικασίες αυτές δύνανται να χρησιμοποιούνται για την εναρμόνιση και την αποτελεσματικότητα της ανταλλαγής των στοιχείων στις έκτακτες περιπτώσεις που αφορούν τη διατροφή των ζώων.

[7] ΕΕ L 228, 11.08.1992, σ. 24

ΕΞΕΔΩΣΑΝ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΟΔΗΓΙΑ:

Άρθρο 1

Η οδηγία 95/53/EK τροποποιείται ως ακολούθως :

1. Το άρθρο 2 παράγραφος 1 στοιχείο α) δεύτερη περίπτωση αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο :

«Στην οδηγία 1999/29/EK του Συμβουλίου της 22ας Απριλίου 1999 για τις ανεπιθύμητες ουσίες και προϊόντα στις ζωοτροφές.»

2. Το άρθρο 2 παράγραφος 1 στοιχείο η) αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο :

« "θέση σε κυκλοφορία" ("κυκλοφορία") : η κατοχή προϊόντων που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στη διατροφή των ζώων, με σκοπό την πώλησή τους, συμπεριλαμβανομένης της πρότασης για πώληση, ή οποιαδήποτε άλλη μορφή εκχώρησής τους σε τρίτους, χαριστικά ή όχι, καθώς και η ίδια η πώληση και οι άλλοι τρόποι εκχώρησης.»

3. Μετά το άρθρο 4 προστίθεται το ακόλουθο άρθρο 4α :

Άρθρο 4α

1. Τα κράτη μέλη καταρτίζουν εθνικά επιχειρησιακά σχέδια παρέμβασης για την αντιμετώπιση καταστάσεων επείγουσας ανάγκης που συνδέονται με τον εντοπισμό σοβαρών κινδύνων για τη δημόσια υγεία, την υγεία των ζώων ή για το περιβάλλον από προϊόντα που προορίζονται για τη διατροφή των ζώων.

2. Σύμφωνα με τη διαδικασία που ορίζεται στο άρθρο 23, η Επιτροπή καθορίζει τα κριτήρια βάσει των οποίων προσδιορίζονται οι ελάχιστες απαιτήσεις για τα εν λόγω σχέδια παρέμβασης μέχρι [τον Οκτώβριο 2000]. Τα κριτήρια αυτά δύναται να τροποποιηθούν λαμβάνοντας υπόψη την κτηθείσα πείρα.

3. Η Επιτροπή εξετάζει τα σχέδια για να αποφασίσει εάν επιτρέπουν την επίτευξη του επιθυμητού στόχου και προτείνει στο ενδιαφερόμενο κράτος μέλος κάθε απαιτούμενη τροποποίηση.

4. Η αποτελεσματικότητα των εν λόγω σχεδίων παρέμβασης πρέπει να επαληθεύεται τακτικά με προσομοιώσεις παντός ενδεχομένου και ιδίως εφόσον πραγματοποιούνται μεταβολές στη δομή των αρμόδιων υπηρεσιών ελέγχου και να τροποποιούνται τα σχέδια εφόσον παρίσταται ανάγκη.

4. Μετά το άρθρο 15 προστίθεται το ακόλουθο τμήμα 3α :

«Τμήμα 3α

Ρήτρα διασφάλισης

Άρθρο 15α

1. Σε περίπτωση που ένα πρόβλημα, το οποίο οφείλεται σε ένα προϊόν που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για τη διατροφή των ζώων, ενδέχεται να δημιουργήσει σοβαρούς κινδύνους για την υγεία των ανθρώπων ή των ζώων ή για το περιβάλλον, εμφανιστεί ή

εξαπλωθεί στο έδαφος της Ευρωπαϊκής Ένωσης, η Επιτροπή, με δική της πρωτοβουλία ή κατόπιν αιτήματος ενός κράτους μέλους, λαμβάνει αμέσως τα ακόλουθα μέτρα, ανάλογα με τη σοβαρότητα της κατάστασης :

- αναστέλλει τη θέση σε κυκλοφορία εντός της Κοινότητας και τις εξαγωγές σε τρίτες χώρες, από ολόκληρο ή τμήμα του συγκεκριμένου κράτους μέλους και/ή
- θεσπίζει ειδικούς όρους για τη θέση σε κυκλοφορία εντός της Κοινότητας και/ή για τις εξαγωγές σε τρίτες χώρες προϊόντων από ολόκληρο ή τμήμα του συγκεκριμένου κράτους μέλους.

2. Η Επιτροπή κοινοποιεί στο Συμβούλιο και τα κράτη μέλη κάθε απόφαση που ελήφθη σύμφωνα με την παράγραφο 1.

Με εξαίρεση έκτακτες καταστάσεις, η Επιτροπή συμβουλευεται τα κράτη μέλη πριν από τη λήψη των μέτρων που αναφέρονται στην παράγραφο 1.

3. Κάθε κράτος μέλος δύναται, εντός 30 ημερών από την εν λόγω κοινοποίηση, να παραπέμψει την απόφαση της Επιτροπής στο Συμβούλιο. Το Συμβούλιο, με ειδική πλειοψηφία, δύναται να λάβει διαφορετική απόφαση εντός 30 ημερών.

4. Σε περίπτωση που ένα κράτος μέλος ενημερώσει επίσημα την Επιτροπή σχετικά με την ανάγκη να ληφθούν προστατευτικά μέτρα, και η Επιτροπή δεν ενεργήσει σύμφωνα με την παράγραφο 1, το εν λόγω κράτος μέλος δύναται να θεσπίσει προσωρινά μέτρα προστασίας σχετικά με τις εμπορικές συναλλαγές. Εφόσον ένα κράτος μέλος θεσπίσει προσωρινά μέτρα προστασίας, ενημερώνει τα λοιπά κράτη μέλη και την Επιτροπή. Η Επιτροπή υποβάλλει το θέμα στη Μόνιμη Επιτροπή Ζωοτροφών, εντός 10 εργασίμων ημερών για γνωμοδότηση σύμφωνα με τη διαδικασία που ορίζεται στο άρθρο 23, με σκοπό την παράταση της ισχύος, την τροποποίηση ή την κατάργηση των εθνικών προσωρινών προστατευτικών μέτρων.»

5. Μετά το άρθρο 16 προτίθεται το ακόλουθο κεφάλαιο "ΙΙΑ" :

« ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ Α

"ΣΥΣΤΗΜΑ ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΚΙΝΔΥΝΟΥΣ ΠΟΥ ΕΜΦΑΝΙΖΟΝΤΑΙ ΣΤΟΝ ΤΟΜΕΑ ΤΩΝ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ

Άρθρο 16α

1. Τα κράτη μέλη ορίζουν ότι εφόσον ένας εμπορευόμενος (εισαγωγέας, ενδιάμεσοι, παραγωγός, κλπ) ή ένα άτομο το οποίο, λόγω των επαγγελματικών δραστηριοτήτων του, κατέχει ή κατείχε ή ήλθε σε άμεση επαφή με μια αποστολή προϊόντων που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για τη διατροφή ζώων, με την ευρύτερη έννοιά της, και γνώριζε ότι :

- η αποστολή των προϊόντων που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για τη διατροφή των ζώων είναι μολυσμένη από επικίνδυνες ουσίες, προϊόντα ή οργανισμούς, ή ενδέχεται να προκύψει κίνδυνος από εσφαλμένη σήμανση ή από τον χειρισμό, τη μεταφορά, την αποθήκευση ή την παραγωγή·

- η αποστολή πρώτων υλών ζωοτροφών δεν πληροί τις διατάξεις που ορίζονται στην οδηγία 1999/29/EK·

και, κατά συνέπεια, έχει επίγνωση του γεγονότος ότι η εν λόγω αποστολή αποτελεί σοβαρό κίνδυνο για την υγεία των ζώων και/ή τη δημόσια υγεία ή για το περιβάλλον, το εν λόγω άτομο ή εμπορευόμενος ενημερώνει αμέσως τις επίσημες αρχές, ακόμα και αν προβλέπεται η καταστροφή, η απόσυρση από την αγορά ή η επανεπεξεργασία του αποστελλόμενου φορτίου.

2. Κατά την επαλήθευση των στοιχείων που παρελήφθησαν, οι επίσημες αρχές λαμβάνουν τα απαραίτητα μέτρα για τη διασφάλιση της μη χρησιμοποίησης των προϊόντων της αποστολής για τη διατροφή ζώων και ειδικότερα θέτουν την αποστολή υπό περιορισμούς και ερευνούν αμέσως :

- τη φύση του κινδύνου και εφόσον απαιτείται το μέγεθος της μόλυνσης·

- την πιθανή προέλευση της μόλυνσης ή του κινδύνου.

Τα κράτη μέλη εξασφαλίζουν ότι ο τελικός προορισμός της μολυσμένης αποστολής, συμπεριλαμβανομένης της πιθανής απολύμανσης, επανεπεξεργασίας ή καταστροφής, δεν δύναται να έχει επιβλαβείς επιπτώσεις για τη δημόσια υγεία ή την υγεία των ζώων ή για το περιβάλλον.

3. Σε περίπτωση που δεν είναι δυνατόν να αποκλεισθεί το γεγονός ότι η μόλυνση ή ο κίνδυνος θα μπορούσαν να έχουν επεκταθεί στην αλυσίδα ζωοτροφών και τροφίμων, ή έχουν εμφανιστεί σε άλλες παρτίδες, οι αρμόδιες αρχές του κράτους μέλους προβαίνουν άμεσα :

- στην αναζήτηση και τη θέση υπό περιορισμό κάθε παρτίδας του προϊόντος που θεωρείται επικίνδυνο, συμπεριλαμβανομένων των ζώντων ζώων που έχουν τραφεί με επικίνδυνες ζωοτροφές και προϊόντα ή παραπροϊόντά τους, διασφαλίζοντας τον συντονισμό μεταξύ των αρμοδίων υπηρεσιών ελέγχου, ιδίως για την αποφυγή της διάθεσης στην αγορά επικίνδυνων προϊόντων και για την εφαρμογή των διαδικασιών απόσυρσης των προϊόντων που έχουν ήδη διατεθεί στην αγορά·

- σε προκαταρκτική εκτίμηση των κινδύνων σχετικά με :

α) την πιθανή διασταυρωμένη μόλυνση με άλλα προϊόντα που χρησιμοποιήθηκαν ή πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στην αλυσίδα ζωοτροφών·

β) την πιθανή ανακύκλωση επικίνδυνων προϊόντων στην αλυσίδα ζωοτροφών

- την άμεση ενημέρωση της Επιτροπής, ιδίως με την παροχή επαρκών στοιχείων για την αναζήτηση και τον εντοπισμό πρώτων υλών ζωοτροφών, ζώντων ζώων και προϊόντων τους, καθώς και σχετικά με τα προστατευτικά μέτρα που προβλέπονται ή έχουν ήδη ληφθεί για να παρασχεθεί η δυνατότητα στην Επιτροπή να ενημερώσει κατάλληλα τα λοιπά κράτη μέλη.

Κάθε ενδιαφερόμενο κράτος μέλος ενημερώνει την Επιτροπή σχετικά με τα μέτρα παρακολούθησης που τυχόν ελήφθησαν σχετικά με τους κοινοποιηθέντες κινδύνους,

συμπεριλαμβανομένων των στοιχείων που αφορούν την παύση της επικίνδυνης κατάστασης.

4. Η Επιτροπή και τα κράτη μέλη διαχειρίζονται το εν λόγω σύστημα για την ανταλλαγή στοιχείων, κατ'εφαρμογή της παρούσας οδηγίας, με την ίδια διαδικασία που εφαρμόζεται για το σύστημα ταχείας προειδοποίησης που έχει θεσπιστεί με την οδηγία 92/59/EΚ του Συμβουλίου για την γενική ασφάλεια των προϊόντων.»

6. Το άρθρο 22 τροποποιείται ως εξής :

1. Προστίθεται η ακόλουθη παράγραφος "2α" :

Τα κράτη μέλη τηρούν μητρώα των αναληφθεισών δράσεων στο πλαίσιο των παρεμβάσεων τους σύμφωνα με το άρθρο 16α παράγραφος 2 και συμπεριλαμβάνουν στην ετήσια έκθεση που υποβάλλεται στην Επιτροπή περίληψη των εν λόγω ενεργειών.

Στην περίπτωση που αυξάνεται η συχνότητα κάποιας συγκεκριμένης μόλυνσης ή κινδύνου που προέρχεται από ένα συγκεκριμένο προϊόν που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί στη διατροφή των ζώων, υποβάλλεται αμελλητί στην Επιτροπή ενδιάμεση έκθεση.

Οι πληροφορίες τις οποίες περιλαμβάνουν οι ενδιάμεσες εκθέσεις αποτελούν το αντικείμενο συζήτησης στο πλαίσιο της Μόνιμης Επιτροπής Ζωοτροφών, έτσι ώστε να ληφθούν τα ενδεδειγμένα μέτρα.

Οι ετήσιες και ενδιάμεσες εκθέσεις υποβάλλονται με βάση το υπόδειγμα που καθορίζεται σύμφωνα με το άρθρο 23.

2. Η πρώτη πρόταση της παραγράφου 3 τροποποιείται ως εξής :

1. Μετά από τις λέξεις "& σε κοινοτικό επίπεδο", παρεμβάλλεται η ακόλουθη φράση : "και περίληψη των ενδιάμεσων εκθέσεων".

2. Η λέξη "σύστασης" αντικαθίσταται από τη λέξη "απόφασης".

Άρθρο 2

Καταργούνται οι παράγραφοι 3 και 4 του άρθρου 12 της οδηγίας 1999/29/EΚ του Συμβουλίου.

Άρθρο 3

1. Τα κράτη μέλη θέτουν σε ισχύ τις νομοθετικές, κανονιστικές και διοικητικές διατάξεις που απαιτούνται για την τήρηση της παρούσας οδηγίας, το αργότερο μέχρι τις [31 Δεκεμβρίου 2000]. Εφαρμόζουν τις εν λόγω διατάξεις από την [1η Ιανουαρίου 2001].

Ενημερώνουν αμέσως περί αυτού την Επιτροπή.

2. Όταν τα κράτη μέλη θεσπίζουν τις προαναφερόμενες διατάξεις, αυτές παραπέμπουν στην παρούσα οδηγία ή συνοδεύονται από τέτοια παραπομπή κατά την επίσημη δημοσίευσή τους. Ο τρόπος της παραπομπής καθορίζεται από τα κράτη μέλη.

3. Τα κράτη μέλη γνωστοποιούν στην Επιτροπή το κείμενο των βασικών διατάξεων εσωτερικού δικαίου που εκδίδουν στο πεδίο που διέπεται από την παρούσα οδηγία.

Άρθρο 4

Η παρούσα οδηγία αρχίζει να ισχύει την εικοστή ημέρα από τη δημοσίευσή της στην Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων.

Άρθρο 5

Η παρούσα οδηγία απευθύνεται στα κράτη μέλη.